Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum Wydział Lekarski

MAŁGORZATA PAWŁOWSKA

Badanie potencjalnego przeciwmiażdżycowego działania doksycykliny nieselektywnego inhibitora metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, na modelu eksperymentalnej miażdżycy u myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE-*knockout* mice)

Praca doktorska

Promotor: Dr hab. med. Jacek JawieńPraca została wykonana w Katedrze Farmakologii UJ CMKierownik Katedry: Prof. dr hab. med. Ryszard Korbut

Kraków 2011

Chciałabym bardzo serdecznie podziękować mojemu Promotorowi - Panu dr hab. med. Jackowi Jawieniowi - za włożony przez Niego wielki trud, a jednocześnie ogromną życzliwość i opiekę podczas tworzenia niniejszej pracy

Pragnę także złożyć gorące podziękowania Kierownikowi Katedry Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego – Panu Profesorowi dr hab. med. Ryszardowi Korbutowi – za umożliwienie mi owocnej pracy naukowej w Katedrze

Dziękuję wszystkim Koleżankom i Kolegom za stworzenie miłej i pełnej inspiracji naukowej atmosfery w Katedrze Farmakologii

Na koniec, pragnę także podziękować mojemu Mężowi oraz Rodzicom – za wyrozumiałość i cierpliwość podczas długotrwałego procesu tworzenia doktoratu

Spis skrótów str. 5
I. Wstęp str. 7
I.1 Miażdżyca str. 7
I.2 Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej str. 10
I.3 MMPs a miażdżyca str. 13
I.4 Inhibitory MMPs str. 16
I.5 Doksycyklina str. 16
I.6 Najnowszy model eksperymentalny miażdżycy str. 18
II. Cele pracy str. 21
III. Materiał i metody str. 22
III.1 Zwierzęta i leki str. 22
III.2 Pobieranie narządów str. 22
III.3 Oznaczanie wielkości miażdżycy str. 26
III.4 Badania immunohistochemiczne str. 34
III.5 Zymografia <i>in situ</i> str. 35
III.6 Badania biochemiczne str. 36
III.7 Lipidy osocza str. 36
III.8 Badanie rozkurczu naczyń str. 36
III.9 Oznaczanie stężenia doksycykliny w surowicy myszy apoE-knockout str. 38
III.10 Analiza statystyczna str. 39
IV. Wyniki str. 41
IV.1 Lipidy str. 41
IV.2 Masa myszy str. 41
IV.3 Stężenie doksycykliny w surowicy str. 41
IV.4 Wielkość miażdżycy str. 42
IV.5 Struktura blaszki i jej stabilność str. 47
IV.6 Osoczowe markery zapalenia str. 49
IV.7 Rozkurcz naczyń str. 52
V. Dyskusja str. 54
VI. Wnioski str. 58
VII. Streszczenie
VIII. Summary str. 61
IX. Piśmiennictwo

SPIS TREŚCI

SPIS SKRÓTÓW

apoE (apolipoprotein E) – apolipoproteina E

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - test immunoenzymatyczny

ECM (extracellular matrix) – macierz zewnątrzkomórkowa

eNOS (endothelial nitric oxide synthase) - śródbłonkowa syntaza tlenku azotu

FITC (*fluorescein isothiocyanate*) – izotiocyjanian fluoresceiny

gene KO (knockout) - wyłączenie genu

HDL (high density lipoprotein) - lipoproteina o wysokiej gęstości

HPLC (*high performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HSP (heat shock protein) – białko szoku cieplnego

IDL (*intermediate density lipoprotein*) – lipoproteina o pośredniej gęstości IFN-γ (*interferon gamma*) – interferon gamma

IL (interleukin) - interleukina

IMA (internal mammary artery) - tętnica piersiowa wewnętrzna

KHB (Krebs-Henseleit buffer) - bufor Krebsa-Henseleita

LC-MS (*liquid chromatography – mass spectrometry*) – połączenie spektrometrii mas z chromatografią cieczową

LDL (low density lipoprotein) – lipoproteina o małej gęstości

MCP-1 (*macrophage chemotactic protein–1*) – białko chemotaktyczne dla makrofagów

MMPs (*matrix metalloproteinases*) - metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

NO (nitric oxide) - tlenek azotu

OCT (*Optimal Cutting Temperature*) – żel mrożeniowy, używany przy cięciu skrawków w kriostacie

ORO (oil red-O) - czerwień oleista

oxLDL (oxidized LDL) – utlenowana cząsteczka LDL

PBS (phosphate saline buffer) – bufor fosforanowy

SAA (serum amyloid A) – surowiczy amyloid A

SMA (*smooth muscle actin*) – α -aktyna mięśniówki gładkiej

TGF-β (transforming growth factor beta) – transformujący czynnik wzrostu beta

Th lymphocyte (*T helper*) – limfocyt T pomocniczy

TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) - tkankowe inhibitory metaloproteinaz

TLR (Toll-like receptor) - receptor Toll podobny

TNF-α (tumor necrosis factor alpha) – czynnik martwicy nowotworów alfa

Treg (*regulatory T cells*) – limfocyt T regulatorowy (dawniej zwany supresorowym)

sVCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) – rozpuszczalna w osoczu adhezyna komórek naczyń typu 1

VLDL (very low density lipoprotein) - lipoproteina o bardzo małej gęstości

I. WSTĘP

I.1 Miażdżyca

Miażdżyca tętnic jest jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych [90, 98, 110, 137, 138]. To przewlekła choroba tętnic, cechująca się tworzeniem charakterystycznych zmian w ścianie naczynia, z naciekami zapalnymi, gromadzeniem lipidów i włóknieniem. Aktualna wiedza o patofizjologii miażdżycy pochodzi głównie z badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, zwłaszcza na myszach wrażliwych na rozwój choroby, wskutek pozbawienia ich genów dla apolipoproteiny E lub receptora LDL [163].

Wiek XX był erą pojmowania miażdżycy jako wyłącznie odkładania się cholesterolu i lipoprotein w ścianie naczyń, z kulminacją tego poglądu w postaci serii przeprowadzonych na wielką skalę badań klinicznych, ukazujących jednoznacznie, że skorygowanie hipercholesterolemii zmniejszało znacząco zachorowalność i śmiertelność w miażdżycy tętnic wieńcowych [123, 142].

Niemal do końca lat 90. zakładano, że miażdżyca rozwija się jako przewlekła odpowiedź na uraz, który powoduje utratę komórek śródbłonka [133]. Uznawano ją przede wszystkim za chorobę zwyrodnieniową [134-136]. Około 20 lat temu badacze zaczęli jednak w coraz większym stopniu skupiać się na innym, dotychczas nieuwzględnianym, aspekcie patogenetycznym miażdżycy — procesie zapalnym.

W 1986 roku Hansson *i wsp.* przy użyciu przeciwciał monoklonalnych odkryli, że małe komórki o okrągłym jądrze, obecne w blaszce miażdżycowej, które dotąd określano jako "małe monocyty", są limfocytami T [82]. Kilka lat później stwierdzili oni, że limfocyty te jako antygen rozpoznają utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości (LDL) — oxLDL [155]. Ponadto w wielu doniesieniach raportowano o istnieniu korelacji pomiędzy miażdżycą a obecnością co najmniej 2 typów mikroorganizmów zakaźnych: *Chlamydia pneumoniae* i *Herpes simplex virus* [161].

Zaczęto się więc zastanawiać, czy proces zapalny nie bierze udziału w miażdżycy. Te rozważania początkowo jednak przyjmowano z dużym sceptycyzmem. Brakowało bowiem jednoznacznego dowodu na istotny wpływ zapalenia na rozwój miażdżycy. Uzyskano go dzięki nowemu zwierzęcemu modelowi miażdżycy — myszy, u której zastosowano technikę celowania genowego (*gene-targeting*), za której wynalezienie Mario R. Capecchi (Stany Zjednoczone), Martin J. Evans (Wielka Brytania) oraz Oliver Smithies (Stany Zjednoczone) otrzymali w 2007 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny.

Dlatego też w 1999 roku Russell Ross ogłosił, że miażdżyca jest chorobą zapalną [137, 138]. Zapalenie występuje jako odpowiedź na czynnik destabilizujący miejscową homeostazę. Czynnikami powodującymi aktywację makrofagów w ścianie tętnic poprzez receptor Toll-podobny (TLR) są: utlenione cząsteczki lipoprotein o małej gęstości LDL (oxLDL), białko szoku cieplnego 60 (HSP60) oraz endotoksyny bakteryjne [66].

Pierwszym etapem rozwoju miażdżycy jest dysfunkcja środbłonka. Dotyczy to przede wszystkim regionów rozgałęzień tętniczych, gdzie przepływ krwi często nie ma charakteru laminarnego. Stąd predylekcja do rozwoju miażdżycy w tych miejscach. Tu następuje odkładanie się cząsteczek LDL w przestrzeni podśródbłonkowej. Akumulacja LDL jest zwiększona, gdy stężenie LDL w surowicy krwi jest zwiększone. Cząsteczka LDL dyfunduje pasywnie i jej odkładanie się w ścianie naczynia wydaje się wynikać z interakcji pomiędzy apolipoproteiną B cząsteczki LDL a proteoglikanami macierzy [14]. Udowodniono, że niezmienione cząsteczki LDL są zbyt wolno "pobierane" przez makrofagi, aby spowodować ich przekształcenie w komórki piankowate. Zasugerowano więc, że cząsteczka LDL zostaje "zmodyfikowana" w ścianie naczynia. Najbardziej znaczącą modyfikacją jest utlenienie (oksydacja) lipidów [54]. W jej wyniku powstaje tak zwana "minimalnie utleniona" cząsteczka LDL. W wyniku powstania tych cząstek jako "obcych" dla organizmu następuje reakcja zapalna [50, 115]. Zanim "minimalnie utleniona" cząsteczka LDL zostanie sfagocytowana przez makrofagi, musi ulec dalszej modyfikacji do "wysoce utlenionej" LDL [157]. Szybki wychwyt tak zmienionych cząstek LDL przez makrofagi zachodzi poprzez receptory zmiatające. Następnym etapem jest "prezentacja antygenu" limfocytom T przez komórki dendrytyczne. Antygenem tym może być fragment "strawionej" przez makrofag, utlenionej lipoproteiny LDL, białko szoku cieplnego 60 (HSP60), β_2 glikoproteina I lub fragmenty antygenów bakteryjnych [64].

W wyniku oddziaływania tych komórek następuje odpowiedź immunologiczna typu T helper 1 (komórkowa) lub typu T helper 2 (humoralna). Obecnie uważa się, że odpowiedź typu Th₁ i jej mediatory: interferon gamma (IFN- γ), czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), interleukina 1, interleukina 12 oraz interleukina 18 działają przyspieszająco na rozwój miażdżycy, podczas gdy odpowiedź typu limfocytów Treg (dawniej zwanych limfocytami T supresorowymi) i jej mediatory: transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) oraz interleukina 10 - hamują rozwój miażdżycy [35].

Stabilna blaszka miażdżycowa najczęściej posiada względnie grubą pokrywę włóknistą chroniącą jądro lipidowe przed zetknięciem z krwią. W niestabilnej blaszce obserwuje się duże jądro lipidowe ze względnie cienką pokrywą włóknistą. W obrębie tak zmienionej blaszki czynniki prozapalne produkowane przez limfocyty T (jak IFN-γ) wydają się odgrywać kluczową rolę, z jednej strony zmniejszając produkcję przez

9

mięśniówkę gładką macierzy zewnątrzkomórkowej, z drugiej zaś — zwiększając produkcję metaloproteinaz przez makrofagi [144].

Miażdżyca jest zatem przewlekłą chorobą zapalną, w większości przypadków zapoczątkowaną i rozwijającą pod wpływem hipercholesterolemii. Hipercholesterolemię oraz zapalenie określono jako "wspólników przestępstwa" (*'partners of crime'*) [152]. Koncepcja miażdżycy jako zapalenia ukształtowała się dopiero w ostatnich latach, lecz obecnie jej wartość jest niekwestionowana, co wiąże się z określonymi konsekwencjami terapeutycznymi [75].

I.2 Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej - kolagenazy, matryksyny (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs) – jest to grupa zależnych od cynku enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz, których podstawową funkcją jest uczestniczenie w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy składników macierzy zewnątrzkomórkowej i degradowania ich (remodeling). Głównym zadaniem układu MMP jest przebudowa strukturalna macierzy pozakomórkowej [170].

W swoim składzie zawierają one zatem atom cynku (Zn²⁺), który pełni rolę katalityczną i strukturalną w cząsteczce enzymu. Syntetyzowane są w komórkach w formie preproenzymu i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jako proenzymy (proMMP) [171]. Aktywacja enzymu następuje przez proteolityczne cięcie w rejonie propeptydu. Aktywność metaloproteaz jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcji, translacji oraz poprzez endogenne inhibitory, takie jak α_2 -makroglobulina i przez swoiste endogenne tkankowe inhibitory metaloproteinaz (*tissue inhibitors of metalloproteinases* - TIMP), składające się z rodziny czterech inhibitorów proteaz: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 and TIMP-4.

Egzogenne syntetyczne inhibitory zwykle posiadają grupę chelatującą, która wiąże katalityczny atom cynku w aktywnym centrum enzymu. Antybiotyk z grupt tetracyklin - doksycyklina, która taką grupę chelatujacą posiada, nawet w subantybakteryjnych dawkach hamuje aktywność MMPs [68]. Obecnie jest ona wykorzystywana klinicznie w stomatologii w leczeniu chorób przyzębia i jest, jak dotąd, jedynym inhibitorem MMPs dostępnym klinicznie [53].

W warunkach fizjologicznych MMPs uczestniczą w procesach, takich jak: embriogeneza, angiogeneza, gojenie ran, biorą udział w agregacji płytek oraz regulują metabolizm jonów.



Ryc. 1 Klasyczna struktura domenowa metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs).

Wszystkie MMPs zawierają N-końcową pro-domenę (PRO). Posiada ona grupę cysteinową, która blokuje dostęp substratów do jonów cynku (Zn⁺⁺), umocowanego przez trzy wiązania wodorowe (H) we wszechobecnej podjednostce katalitycznej (CAT). W przypadku MMP-2 i MMP-9 domena CAT posiada dodatkowe wstawki "fibronektynowe". Aktywacja proformy zachodzi poprzez przecięcie proteolityczne łącznika pomiędzy domenami PRO i CAT. Większość MMPs posiada również domenę PEX, która modyfikuje rozpoznanie substratu i aktywację proformy (zmodyfikowane z [171]).

Badania prowadzone na początku lat 90. dowiodły, że MMPs odznaczają się swoistością substratową.

W zależności od swoistości substratowej i budowy cząsteczki, metaloproteinazy dzieli się na pięć zasadniczych podgrup:

1. kolagenazy (MMP-1, MMP-8, MMP-13)

2. żelatynazy (MMP-2, MMP-9)

3. proteinazy podścieliska (stromolizyny) (MMP-3, MMP-10, MMP-11)

4. matrylizyny (MMP-7)

 metaloproteinazy błonowe (*membrane-type metalloproteinases* – MT-MMP) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17)

Zmiany aktywności metaloproteinaz zaobserwowano również w wielu stanach patologicznych, takich jak: procesy zapalne, choroby degeneracyjne oraz w nowotworach. Klasyczne zapalne czynniki transkrypcyjne: NF-κB and AP-1 są ważnymi regulatorami MMP-9 [8].

Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w progresji nowotworów, poprzez pobudzanie wzrostu komórek raka, migrację, inwazję, tworzenie przerzutów i nowych naczyń krwionośnych [132]. Wydzielanie i aktywność MMP jest zwiększone prawie we wszystkich typach nowotworów u ludzi i koreluje ze stopniem zaawansowania, większą inwazyjnością, zdolnością do dawania przerzutów, a także z krótszym okresem przeżycia. Opisano rolę MMP i TIMP w przerzutach nowotworowych [24], w tym rolę MMPs w rozwoju raka jelita grubego [61].

Inhibitory MMPs stosuje się w zapobieganiu rozwojowi tętniaków aorty [3], w chorobach nerek [23], w chorobach reumatycznych [28, 67], w leczeniu tendinopatii [106] oraz w gojeniu się ran [56].

W niniejszej pracy szczególną uwagę zwrócimy na dwie metaloproteinazy, zwane żelatynazami: MMP-2 i MMP-9.

Metaloproteinaza 2 (**MMP-2**) zwana również żelatynazą A, razem z **metaloproteinazą 9** (**MMP-9**) - żelatynazą B, odpowiadają za degradację kolagenu typu IV – głównego składnika błony podstawnej oraz żelatyny - tzn. zdenaturowanego kolagenu. Posiadają również zdolność do degradowania innych typów kolagenu (IV, V, VII, X) oraz elastyny i fibronektyny.

MMP-2 i MMP-9 odgrywają ważną rolę w wielu procesach, jak: rozwój embrionalny, morfogeneza, remodeling tkanek.

Swoiste hamowanie ich aktywności odbywa się przez inhibitory tkankowe (TIMPs), a nieswoiste głównie przez α_2 -makroglobulinę. MMP-2 i MMP-9 odgrywają ponadto ważną rolę w procesie wzrostu i przerzutowania nowotworów oraz w zapaleniu stawów.

I.3 MMPs a miażdżyca

W ostatnich latach stwierdzono, że MMPs odgrywają istotną rolę w powstawaniu blaszki miażdżycowej [5, 9, 10, 51, 81, 156, 168, 170].

Rozkład macierzy pozakomórkowej jest ściśle regulowany w obrębie ściany naczyniowej poprzez równowagę pomiędzy proteinazami, a ich endogennymi inhibitorami. Jednakże w obrębie blaszki miażdżycowej ta równowaga może ulec przesunięciu w stronę rozkładu macierzy, ponieważ makrofagi obecne w blaszce i fenotypowo zmienione komórki mięśni gładkich naczyń wydzielają cały panel proteinaz, w tym metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej [81].

Aktywowane komórki w zapalnej blaszce miażdżycowej (jak makrofagi, komórki mięśni gładkich oraz komórki śródbłonka) produkują zatem MMPs, w tym

żelatynazy: MMP-2 i MMP-9 [16, 52, 69]. Obniżenie stężenia lipidów może zapobiegać ostrym powikłaniom wieńcowym częściowo przez zmniejszanie zapalenia, w tym ekspresji i aktywności MMP-2 i MMP-9 [89]. I rzeczywiście, studia kliniczne i genetyczne korelowały MMP-2 i MMP-9 ze zdarzeniami sercowo-naczyniowymi u pacjentów [12, 42, 47, 70, 121, 178].

U ludzi opisano związek podwyższonego osoczowego poziomu MMP-2 z miażdżycą tętnic szyjnych [112], zwiększoną ekspresję MMP-2 i MMP-9 w zmianach miażdżycowych i tętniakach tętnic mózgowych [17]. MMP-9 jest konieczne we wczesnej fazie rozwoju blaszki u myszy [26] oraz w pęknięciu blaszki miażdżycowej [60, 101, 104].

Opisano zwiększoną aktywność MMP-9 w niestabilnej blaszce miażdżycowej w ostrych zespołach wieńcowych [49]. Z kolei MMP-2 wydaje się w związku ze swoim wewnątrzkomórkowym działaniem na troponinę I odgrywać rolę czynnika odpowiedzialnego za niedokrwienne i poreperfuzyjne uszkodzenie mięśnia sercowego [166]. Polimorfizmy w genie kodującym MMP-3 wpływały na wielkość miażdżycy w tętnicach wieńcowych oraz ryzyko zawału u ludzi [11]. W zmianach miażdzycowych zaobserwowano podwyższoną ekspresję TIMP-1, -2, oraz -3 [45, 51]. TIMP-2 hamuje miażdżycę u myszy [81]. MMPs odgrywają także poważną rolę w patogenezie niewydolności serca [147, 148].

U myszy apoE-*knockout* aktywność MMPs odgrywa ważną rolę w aterogenezie [104, 178]. W 2001 roku Silence *i wsp.* opisał, że myszy z wyłączonym genem dla MMP-3 miały co prawda większą miażdżycę, lecz równocześnie zwiększoną akumulację kolagenu w blaszkach i mniej częste tętniaki [146]. I odwrotnie, myszy

transgeniczne z nadekspresją ludzkiej MMP-1 miały zmniejszona miażdżycę z powodu nasilonego trawienia kolagenu w neointimalnej macierzy pozakomórkowej [87].

Dostarczenie myszom miażdżycowym (apoE-*knockout*) genu ludzkiej TIMP-1 poprzez wstrzyknięcie adenowirusów spowodowało hamowanie progresji blaszki miażdżycowej i zwiększenie stabilności blaszki [80, 139]. U myszy pozbawionych TIMP-1 następowała zwiększona degradacji medii z tworzeniem się pseudotętniaków [88].

Pozbawienie myszy genu dla MMP-2 hamowało z kolei rozwój miażdżycy [84]. U szczurów wykazano związek zwiększonej aktywności MMP-2 z remodelingiem i starzeniem się tętnic [167, 169].

Utrata MMP-9 (lecz nie MMP-12) chroni myszy przeciwko destrukcji medii i wzrostowi samej blaszki miażdżycowej [91]. Zaś usunięcie MMP-9 powoduje hamowanie tętniaków aorty [125]. Ten sam efekt zaobserwowano po podaniu simwastatyny myszom miażdżycowym [153].

Celem niniejszego badania było sprawdzenia, czy podawanie nieswoistego egzogennego inhibitora metaloproteinaz: doksycykliny może prowadzić do rozwoju mniejszych zmian miażdzycowych na eksperymentalnym modelu aterogenezy: myszy apolipoproteina E (apoE) - *knockout* [73] i czy jest to związane ze zmniejszeniem aktywności metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej typu 2 i 9.

I.4 Inhibitory MMPs

MMPs są rozpatrywane jako hipotetyczny cel terapeutyczny w zapobieganiu miażdżycy. Syntetyczne inhibitory zwykle zawierają grupę chelatującą, która wiąże ściśle katalityczny atom cynku w aktywnym centrum MMP. W skład klasycznych grup chelatujących wchodzą hydroksamaty, karboksylazy, tiole oraz fosfiny. Hydroksamaty są szczególnie silnymi inhibitorami MMPs i innych cynkowo-zależnych enzymów, w związku z ich dwustronną chelacją atomu cynku.

I.5 Doksycyklina

Doksycyklina to organiczny związek chemiczny, półsyntetyczny antybiotyk z grupy tetracyklin. Jest to karboksamid (4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-4-(dimetylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroksy-6-metylo-1,11-diokso-2naftacenu (ryc. 2).



Ryc. 2. Wzór chemiczny doksycykliny.

Mechanizm działania przeciwbakteryjnego doksycykliny polega na hamowaniu rybosomalnej biosyntezy białka, poprzez związanie się z podjednostką rybosomalną S30. W wyniku tego wiązanie pomiędzy tRNA oraz kompleksem rybosom-mRNA zostaje zablokowane.

W porównaniu do innych tetracyklin, doksycyklina znacznie lepiej wchłania się z przewodu pokarmowego (w 90-95%), jest również mniej nefrotoksyczna. Oporność krzyżowa obserwowana wśród bakterii na tetracykliny naturalne często nie dotyczy doksycykliny, która okazuje się skuteczna.

Okres półtrwania doksycykliny wynosi 16 godzin (± 6 godzin). Doksycyklina jest wydalana z żółcią. Przenika z krwi do jelita grubego, co umożliwia jej zastosowanie u chorych z niewydolnością nerek. W porównaniu z innymi tetracyklinami ma dłuższy okres działania, przez co musi być inaczej dawkowana.

Doksycyklina jest stosowana głównie w dermatologii i otolaryngologii. W innych specjalnościach klinicznych ma mniejsze zastosowanie, m.in. ze względu na dość często spotykaną odporność bakterii na ten lek. Do schorzeń leczonych tym antybiotykiem należą m.in.:

- 1. choroby skóry w tym w ciężkich postaciach trądziku
- 2. zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych
- 3. zakażenia tkanek miękkich
- 4. zakażenia przewodu pokarmowego
- 5. zakażenia układu moczowo-płciowego
- 6. zapalenia przyzębia
- 7. malaria
- 8. dur plamisty,
- 9. dżuma (jako antybiotyk drugiego rzutu)
- 10. tularemia

Ze względu na jej własności chelatujące jony metali, doksycyklina w subantybakteryjnych dawkach działa jako inhibitor szerokiego spektrum dla MMP [140]. Jest to ponadto, jak dotąd, jedyny inhibitor MMP, który jest używany w klinice.

I.6 Najnowszy model eksperymentalny miażdżycy

Od roku 1992 mysz stała się znakomitym obiektem badań nad miażdżycą, zastępując dotychczasowe modele zwierzęce [33, 73, 97, 109, 120, 129]. Wówczas to bowiem zostały stworzone, prawie równocześnie w dwóch laboratoriach w Stanach Zjednoczonych, myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E [*apolipoprotein E* (*apoE*) – *knockout*] [117, 118]. Myszy te zostały wkrótce określone jako "wiarygodny i użyteczny, najlepszy obecnie model zwierzęcy miażdżycy" [95].

"*Gene targeting*" (celowanie genowe) – technika, dzięki której powstały wyżej wymienione myszy - polega na homologicznej wymianie genów. W procesie tworzenia myszy *apoE knockout* (inne nazwy angielskie: *apoE null* lub *apoE deficient*), następuje zastąpienie prawidłowego genu kodującego apolipoproteinę E przez gen zmutowany, nie produkujący apolipoproteiny E. Taka mysz, w terminologii polskiej, posiada *znokautowany, wyłączony, zerowy* lub *zinaktywowany* gen kodujący apolipoproteinę E. W dalszym części pracy będziemy posługiwać się dla ułatwienia najpopularniejszą nazwą: myszy apoE-*knockout* (apoE-KO).

Apolipoproteina E (apoE) jest ligandem, odpowiedzialnym za wychwyt z krążenia lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL – very low density lipoproteins), lipoprotein o pośredniej gęstości (IDL – *intermediate density lipoproteins*), lipoprotein o dużej gęstości (HDL - *high density lipoproteins*) oraz remnantów chylomikronów [15, 39, 93, 96, 158, 172]. ApoE jest syntetyzowana głownie w hepatocytach, ale jest również wytwarzana w innych komórkach – w tym w makrofagach, komórkach nerwowych i glejowych. Jest obecna w chylomikronach, IDL, VLDL i HDL i pośredniczy w wychwycie wymienionych lipoprotein w wątrobie, zarówno przez receptor LDL, jak i przez związane z nim białko LRP (*LDL receptor – related protein*).

Pierwszy model eksperymentalny miażdżycy: genetycznie zmieniony szczep myszy apoE – *knockout* stworzono w roku 1992, poprzez zastosowanie metody rekombinacji homologicznej w komórkach linii zarodkowej (*embryonic stem cells*) [117, 118, 177]. Tak zmienione komórki wszczepiano do blastocysty myszy szczepu C57BL/6J, którą zaimplantowano do macicy. Jako potomstwo uzyskano w ten sposób mysz "chimerę", którą krzyżowano z myszą C57BL/6J ("wild type"), uzyskując w drugim pokoleniu homozygotyczne myszy apoE – *knockout* [20, 25, 58, 93, 131]. Wyłączenie genu dla apoE spowodowało powstanie myszy o fenotypie o całkowitym braku ekspresji apoE, jednakże z zachowaniem płodności i żywotności [15].

Myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E, w przeciwieństwie do wszystkich innych modeli zwierzęcych, rozwijają miażdżycę spontanicznie, bez konieczności stosowania diety wysokocholesterolowej [65, 71, 111]. Jednakże w przeciwieństwie do człowieka, najwcześniejsze i najbardziej zaawansowane zmiany występują w zatokach wieńcowych aorty, należących do tzw. "korzenia aorty" ("*aortic root*"), czyli cześci aorty znajdującej się jeszcze w obrębie mięśnia serca.

Większość pozostałych modeli miażdżycy rozwija tylko morfologicznie wczesne zmiany [nacieki tłuszczowe ("*fatty streaks*"), bez złogów lipidowych pozakomórkowych]. Problem ten rozwiązało stworzenie modelu myszy apoE–*knockout*, które rozwijają zmiany miażdżycowe zarówno wczesne, jak i zaawansowane [4, 46, 95, 105, 119, 164]. Wykazano podobieństwo morfologiczne zaawansowanych zmian miażdżycowych u myszy apoE – *knockout* do zmian u człowieka. Ponadto myszy te rozwijają nadciśnienie tętnicze [29, 37, 79, 174].

Na diecie niskotłuszczowej i niskocholesterolowej u myszy tych surowiczy poziom cholesterolu wynosi około 494 mg/dl, w porównaniu z 60 mg/dl u myszy C57BL/6J. Już w wieku 10 tygodni u myszy apoE – *knockout* rozwijają się wczesne zmiany miażdżycowe w części aorty w pobliżu zastawek, mieszczącej się w obrębie mięśnia serca, których powierzchnia wynosi około 3157 ± 437 μ m², w porównaniu z 0 ± 0 μ m² u myszy C57BL/6J. W późniejszym wieku zmiany miażdżycowe są bardziej zaawansowane [118]. Po osiągnięciu 8-9 miesięcy następuje znamienny wzrost wielkości zmian, jak również ich komórkowej złożoności. W zależności od rodzaju eksperymentu autorzy wykorzystują myszy apoE – *knockout* w wieku od 16 do nawet 60 tygodnia życia (zwykle około 24 tygodni) [99, 130].

Stworzenie tego właśnie modelu zmieniło oblicze badań nad patogenezą miażdżycy, umożliwiło między innymi uformowanie nowej definicji miażdżycy jako przewlekłego procesu zapalnego i pozwoliło na przebadanie szeregu leków pod kątem ich ewentualnego działania przeciwmiażdżycowego [21, 43, 44, 107, 141, 160].

Ani hodowle komórkowe, ani badania kliniczne nie pozwalają dokonać wstępnych prób nowych możliwości terapeutycznych leków. Niedawno napisano, że stworzenie myszy z homologiczną wymianą genów ("*gene-targeted*") było prawdziwym przełomem w eksperymentalnych badaniach podstawowych nad leczeniem miażdżycy [126, 141, 151].

II. CELE PRACY

Celem niniejszej pracy było zbadanie na najnowszym modelu eksperymentalnym miażdżycy - myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E (apoE-*knockout* mice) doksycykliny w dawkach subantybakteryjnych, pod kątem ewentualnego działania przeciwmiażdżycowego, jako uznanego nieswoistego inhibitora metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej. W niniejszej pracy skupiliśmy się głównie na hamowaniu przez doksycyklinę żelatynaz (MMP-2 i MMP-9).

W tym celu zgromadzono dwie grupy (grupa kontrolna + grup z podawanym lekiem) myszy apoE-*knockout*, po 15 myszy w każdej.

Za pomocą dwóch metod: "en face" i "cross-section" mierzono wielkość miażdżycy w obu grupach. Metodami immunohistochemicznymi badano skład blaszek pod kątem obecności makrofagów i komórek mięśniówki gładkiej naczyń.

Metodą zymografii in situ mierzono aktywność żelatyna macierzy.

Ze względu na stosowanie niskich, subprzeciwantybiotykowych dawek doskycykliny, zmierzono poziom doskycykliny u leczonych myszy.

Z osocza krwi mierzono poziom całkowitego cholesterolu i triglicerydów oraz cholesterolu frakcji LDL i HDL, celem stwierdzenia ewentualnego wpływu podawanego leku na profil lipidowy.

Także z osocza mierzono stężenie prozapalnych czynników: MCP-1, sVCAM-1, IL-6, IL-12 oraz SAA.

W obu grupach wykonano również pomiary rozkurczu ringów aortalnych, celem stwierdzenia wpływu leku na ewentualną dysfunkcję śródbłonka.

III. MATERIAŁ I METODY

III.1 Zwierzęta i leki

Trzydzieści 8-tygodniowych samic myszy z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (apoE – *knockout*), o podłożu genetycznym C57BL/6J [164], zakupiono w fimie Taconic (Ejby, Dania) [18, 19]. Zwierzęta te podzielono na dwie grupy o liczebności n=15. Myszy były trzymane przez 16 tygodni w Zwierzętarni Katedry Immunologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum UJ, w cyklu dobowym (12-h ciemności/12-h światła), w klimatyzowanym pomieszczeniu (22.5±0.5°C, wilgotność 50±5%), przy dostępie do wody i pożywienia "chow diet" *ad libitum*.

Oprócz grupy kontrolnej, grupa eksperymentalna (w każdej n=15) otrzymywała tę samą dietę, zmieszaną z doksycykliną (Sigma-Aldrich, Warszawa, Polska) w dawce 1,5 mg/ kg m.c./ dobę. Dawka leku została ustalona na podstawie piśmiennictwa.

Wszystkie procedury z udziałem zwierząt zostały zaakceptowane przez Komitet Etyczny ds. Badań na Zwierzętach Uniwersytetu Jagiellońskiego.

III.2 Pobieranie narządów

W wieku 6 miesięcy myszy zostały poddane następującej procedurze [35, 74, 76-78, 110]:

- 1. Oznaczenie myszy.
- 2. Zważenie myszy.
- Wstrzyknięcie dootrzewnowe 1000 IU Fraxiparyny (Sanofi-Synthelabo, Santea, Francja) 10 minut przed znieczuleniem.

- Eutanazja pod znieczuleniem dootrzewnowym 10 mg Tiopentalu (Sandoz, Wiedeń, Austria), przez dokonanie translokacji rdzenia kręgowego.
- 5. Rozłożenie za kończyny na deseczce.
- 6. Polanie 70% alkoholem.
- 7. Rozcięcie skóry od brzucha w górę i otwarcie otrzewnej.
- Przecięcie opłucnej, okrojenie mostka z dwóch stron i odsunięcie go do góry przez spięcie klemem.
- 9. Pobranie krwi przez wkłucie do prawej komory serca.
- Osocze było uzyskiwane przez wirowanie krwi z prędkością 1000×g w 4°C przez 10 minut. Następnie jest ono składowane w plastykowych eppendorfach w −80° C.
- 11. Nacięcie uszka prawego przedsionka. Następnie układ krążenia perfunduje się PBS-em, nakłuwając igłą strzykawki koniuszek lewej komory, utrzymując stałe ciśnienie 100 mm Hg, aż do "zblednięcia" wątroby.
- 12. Odcięcie mostka i odsłonięcie grasicy, obustronne przecięcie żeber w celu poszerzenia dojścia.
- 13. Dalsze czynności wykonywane są pod mikroskopem
- 14. Wycięcie grasicy, aż do odsłonięcia łuku aorty (ryc. 3) i oczyszczenia go in situ.



Ryc. 3. Odsłonięty łuk aorty (z widoczną biało zabarwioną miażdżycą) (powiększenie \times 3).

15. Odsunięcie lewego płuca i serca na bok.

- 16. Odsłonięcie aorty piersiowej.
- 17. Odcięcie aorty piersiowej od kręgosłupa i oczyszczenie jej in situ.
- 18. Odsłonięcie nerek przez wycięcie jelit i wątroby.
- 19. Odsłonięcie aorty brzusznej aż do rozdwojenia biodrowego oraz oczyszczenie jej *in situ*.
- 20. Przecięcie przepony i połączenie aorty piersiowej i brzusznej w odcinku okołonerkowym.
- 21. Oczyszczenie aorty in situ przez oddzielenie tłuszczu i przydanki (ryc. 4).
- 22. Odcięcie aorty tuż przy sercu od góry i za rozdwojeniem biodrowym od dołu.



Ryc. 4. Cała aorta wypreparowana.

- 23. Zanurzenie wypreparowanej aorty w 4% roztworze formaldehydu w PBS.
- 24. Rozcięcie wzdłużne aorty.
- 25. Rozpięcie aorty na płytce woskowej przy pomocy bardzo cienkich igiełek (ryc.
- 5).



Ryc. 5. Aorta rozpięta na płytce woskowej, gotowa do barwienia.

26. Wycięcie serca, przekrojenie na pół (ryc. 6) i zanurzenie górnej części z "korzeniem aorty" w specjalnej miseczce plastykowej, wypełnionej żelem OCT (podstawą cięcia do dołu, górna część serca z "korzeniem aorty" w górze) (ryc. 7, 8).



Ryc. 6. Krojenie poprzeczne serca skalpelem (powiększenie × 3).





Płaszczyzna cięcia (niebieska linia) jest lekko przesunieta zgodnie z ruchem wskazówek zegara w stosunku do płaszczyzny, jaką wyznacza odległość 1.5 mm od dolnych krawędzi obu uszek (zielona linia). Jest to spowodowane dążeniem do ustawienia płaszczyzny cięcia jak najbardziej zbliżonej do prostopadłej w stosunku do "korzenia aorty".



Ryc. 8. Przecięte serce, zanurzone w żelu OCT w plastykowej foremce.

III.3 Oznaczanie wielkości miażdżycy

A. METODA "CROSS-SECTION"

Przecięte poprzecznie serce (ryc. 7) i znajdujący się w obrębie mięśnia serca początkowy odcinek aorty wstępującej (tzw. *"korzeń aorty"*) zostały umieszczone w specjalnych plastykowych foremkach o wymiarach 15×15×5 mm (CryoMolds) (Tissue-Tek, USA), wypełnionych poprzednio po brzeg żelem mrożeniowym OCT (Optimal Cutting Temperature) (CellPath, Oxford, UK) (ryc. 8).

Foremki te natychmiast zamrożono do temperatury –80°C. Serca umieszczono w plastykowej foremce tak, aby płaszczyzna cięcia skalpelem dotykała podstawy foremki. Następnie po wyjęciu z zamrażarki, dziesięcio-mikrometrowej grubości skrawki były cięte w kriostacie, w temperaturze –20°C, przy użyciu standaryzowanego protokołu [159].

Seryjne skrawki z kriostatu (Leica, Jung CM1800, Niemcy), posiadającego tzw. "ruchomą głowicę" (niezbędną do uzyskania prawidłowego cięcia poprzecznego aorty pod kątem prostym) cięto z proksymalnego, około 1-milimetrowego odcinka aorty wstępującej, zwanej "korzeniem aorty" (ryc. 7). Osiem skrawków zbierano w odstępach 100-µm, rozpoczynając od odległosci 100-µm od pojawienia się wszystkich trzech płatków zastawki aortalnej według poniższego protokołu:

Procedura uzyskania obrazu płytek miażdżycowych w sekcjach poprzecznych początkowego odcinka aorty

A. Sekcja początkowego odcinka aorty ("aortic root") myszy, idąc w górę, aż od poziomu dolnego brzegu zastawek. W momencie dojścia do poziomu początku pierwszej zastawki ("punkt zero"), korzystając z ruchomej głowicy, bloczek należy ustawić przestrzennie tak, aby w skrawkach były widoczne równocześnie wszystkie trzy zastawki (ryc. 9, 10). Od tego momentu tnie się w góre co 100 μm skrawki o grubości 10 μm, aż do wysokości 800 μm powyżej pierwszej sekcji (ryc. 11).

Sekcje te musza być wykonane w kriostacie, ponieważ metodą parafinową wypłukałoby się lipidy, niezbędne do zobrazowania płytki miażdżycowej.



Ryc. 9. Schemat obrazujący trudności związane z uzyskaniem w kriostacie cięcia poprzecznego, prostopadłego do osi aorty (z [72]).

Na różowo zaznaczone są płatki zastawki aortalnej w przekroju poprzecznym. "*Punkt zero*" oznacza moment, w którym podczas cięcia w kriostacie uwidacznia się początek pierwszego płatka (proszę porównać z ryc. 10 D).

Aby uzyskać cięcia prostopadłe do osi "korzenia aorty", należy zmieniać (pod kontrolą skrawków oglądanych w mikroskopie) płaszczyznę cięcia ostrza kriostatu tak, aby stała się "idealną płaszczyzną cięcia" (żółta). Służy temu specjalna procedura ("North South West East") zmiany położenia ruchomej głowicy kriostatu, w zależności od ustawienia przestrzennego uzyskanego "punktu zero" (*nie przytaczana w niniejszej pracy dla uproszczenia*).



Ryc. 10. Krojenie mięśnia serca w kriostacie, idąc płaszczyzną ostrza kriostatu w górę, w kierunku "korzenia aorty" (z [72]).

A. Początek krojenia – na obrazie widoczny sam mięsień serca

(Proszę pamiętać, że w rzeczywistości podczas krojenia skrawków w kriostacie, pokazane poniżej obrazy widoczne pod mikroskopem są bezbarwne).

B. Dalsze krojenie – pojawiają się tzw. "robaczki" ("worms")

C. "Robaczki" zaczynają formować ściany naczy
ń-aorty i pnia płucnego

D. Aorta. Proszę zwrócić uwagę na (zaznaczony niebieską strzałką) pojawiający się tzw. "*punkt zero*" na płatku zastawki w dolnej części ryciny. Od tego momentu należy wykorzystać ruchomość głowicy kriostatu i tak nastawić przestrzennie bloczek, aby na przekroju były widoczne wszystkie trzy płatki (aby płaszczyzna cięcia była prostopadła do osi długiej "korzenia aorty").

E. Pierwszy płatek jest wyraźnie widoczny, a pozostałe dwa zaczynają się tworzyć

F. Trzy płatki zastawki aortalnej w pełni widoczne



Ryc. 11. Obraz kolejnych sekcji poprzecznych "korzenia aorty" co 100 μm, licząc od "punktu zero", w którym podczas cięcia pojawia się pierwszy płatek.

Miarą wielkości miażdżycy z każdego serca jest średnia arytmetyczna z 8 kolejnych skrawków aorty, zbieranych co 100 µm, począwszy od "punktu zero".

Po utrwaleniu w 4% paraformaldehydzie (pH 7.0), skrawki barwiono hematoksyliną Meyera oraz czerwienią oleistą [oil red-O (ORO)] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) według poniższego protokołu [6]:

Utrwalenie skrawków formaldehydem i barwienie hematoksyliną oraz czerwienią oleistą (oil red - O):

- "stock solution": 0.5-1g oil red O (czerwień oleista) w 100 ml isopropanolu (propanol 2). Roztwór nasycony.
- "roztwór roboczy": 24 ml "stock solution" + 16 ml wody destylowanej.
 Pozostawić na 10-15 minut przed użyciem.
- 3. zamrożone sekcje utrwalić w 4% roztworze formaldehydu w PBS (10 minut)
- 4. przemyć wodą destylowaną
- 5. zanurzyć w 60% roztworze isopropanolu (1-2 minut)
- 6. zanurzyć w oil red O (10-20 minut)
- 7. przemyć wodą (5 minut)
- 8. hematoksylina (15-30 sekund)
- 9. przemywać w ciepłej wodzie, aż jądra komórkowe staną się niebieskie
- 10. zamknąć preparat w rozpuszczalnym w wodzie medium

Skrawki zabarwione ORO były analizowane pod mikroskopem Olympus BX50 (Olympus, Tokio, Japonia) i użyte do oceny ilościowej. Obrazy z aorty zbierano przy użyciu aparatu cyfrowego Olympus Camedia 5050 i przechowywano jako pliki TIFF o rozdzielczości 1024×768 pikseli. Całkowita powierzchnia płytki miażdżycowej była mierzona półautomatycznie na każdym szkiełku, przy użyciu programu AnalySIS FIVE

software (Soft Imaging System, Munster, Niemcy) (ryc. 12) [6, 36, 100, 108, 124, 149, 150].

Dla każdej myszy średnią wielkość powierzchni miażdżycy obliczano z ośmiu oddalonych od siebie o 100-μm skrawków, co w najdokładniejszy sposób odzwierciedlało powierzchnię przekroju poprzecznego ("cross-section") zajętą przez miażdżycę [102, 103, 108].



Ryc. 12. Komputerowa ocena wielkości miażdżycy w przekroju poprzecznym "korzenia aorty" (z [72]).

B. METODA "EN FACE"

Aorty od łuku do rozdwojenia biodrowego były utrwalane w 4% formaldehydzie, otwierane wzdłużnie, przypięte cienkimi igiełkami do czarnych płytek woskowych i zabarwione Sudanem IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), według poniższego protokołu:

1. Rozpiąć aortę wyjętą z 4% formaldehydu na płytce przy pomocy bardzo cienkich igiełek (Fine Science Tools, Heidelberg, Niemcy).

2. Przepłukać w 70% etanolu przez 5 minut.

3. Barwić w roztworze roboczym (working solution) Sudanu IV przez 6 minut.

4. Płukać dwukrotnie w 80% etanolu przez całkowity okres 3 minut.

5. Przechowywać w PBS-ie w lodówce (lub w formaldehydzie dla dłuższego przechowywania).

Powierzchnia zmian miażdżycowych aorty i całkowita powierzchnia aorty były obliczane przy użyciu programu LSM Image Browser software (Zeiss, Jena, Germany) (ryc. 13).





A – aorta barwiona Sudanem IV; B – całkowita powierzchnia aorty; C – powierzchnia zmian miażdżycowych.

III.4 Badania immunohistochemiczne

Do wykonania barwień immunohistochemicznych zostały wykorzystane skrawki aorty wstępującej utrwalone w acetonie i wysuszone. Skrawki te były preinkubowane w roztworze 5% nieimmunogennej surowicy koziej z dodatkiem 2% suchego odtłuszczonego mleka w celu wyblokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał. Inkubacje z przeciwciałami pierwotnymi przeprowadzano przez noc w temperaturze pokojowej w komorach wilgotnych w następującej kombinacji surowic: skoniugowane z Cy3 przeciwciała mysie przeciwko α-aktynie mięśni gładkich (SMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [rozcieńczenie 1:600] oraz szczurze przeciwciała przeciwko mysiemu antygenowi CD68 (Serotec, Oxford, UK) [rozc. 1:800].

Po wypłukaniu w buforze PBS zastosowano przeciwciała drugiego rzedu: biotynylowaną kozią surowicę przeciwko szczurzym immunoglobulinom (Jackson IR, West Grove, PA, USA).

Po wypłukaniu, jako ostatni etap reakcji immunohistochemicznej, skrawki inkubowano ze streptawidyną skoniugowaną z fluoresceiną (DTAF) (Jackson IR, West Grove, PA, USA) [rozc. 1:500]. Skrawki po ostatecznym wypłukaniu zamykano w glicerolu w PBS o pH 8,6 [130].

Skrawki były oceniane przy użyciu epifluorescencyjnego mikroskopu Olympus BX50 (Olympus, Tokyo, Japan), wyposażonego w odpowiednie zestawy filtrów (U-MNG, U-MNIBA), aby uwidocznić odpowiednio czerwoną (Cy3) i zieloną (DTAF) fluorescencję. Obrazy były rejestrowane przy użyciu cyfrowej kamery CCD Olympus DP71.

W każdym skrawku, całkowita powierzchnia zajmowana przez CD68immunopozytywne makrofagi oraz przez α-aktynę mięśni gładkich była mierzona przy użyciu oprogramowania AnalySIS FIVE (Olympus).

III.5 Zymografia in situ

Zymografia jest metodą służącą do pomiaru aktywności proteolitycznej enzymów. Zymografię *in situ* wykonano w celu wykazania na skrawkach histologicznych miejsc aktywności żelatynaz (MMP-2 oraz MMP-9). Metoda ta pozwala na rzeczywistą detekcję aktywnego enzymu, a nie jego nieaktywnego proenzymu lub formy zablokowanej przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz.

Do wykonania zymografii wykorzystano skrawki nieutrwalone. W komorze wilgotnej skrawki inkubowano przez okres 2 h w 37°C w buforze reakcyjnym zawierającym 50 mg/ml żelatyny świńskiej skoniugowanej z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Skrawki zostały dokładnie wypłukane w PBS, utrwalone przez 5 min w 4% zbuforowanym paraformaldehydzie, a następnie zamkniete w glicerynie/PBS [143].

Preparaty zymograficzne przeglądano w mikroskopie Olympus BX-50 w opcji epifluorescencji. Fluorescencję odpowiadającą miejscom aktywności żelatynaz wzbudzano z wykorzystaniem wąskopasmowego filtra dla FITC (U-MNIBA). Obrazy rejestrowano przy użyciu cyfrowej kamery CCD Olympus DP71 i zapisywano je w postaci plików obrazowych (TIFF) o rozdzielczości 5 MPix.

Powierzchnia, wykazująca charakterystyczną zieloną fluorescencję wynikającą z enzymatycznego rozpadu znakowanej FITC żelatyny, jest reprezentatywna dla lokalnej aktywności żelatynaz. Całkowita powierzchnia aktywności MMP (wskazująca na stopień zaawansowania procesu), jak również intensywność fluorescencji (odzwierciedlająca aktywność enzymu; średnia intensywność piksela w zielonym kanale: rozpiętość 0-255) były mierzone w dziewięciu skrawkach z każdej próbki. Do pomiaru powierzchni jak i intensywności fluorescencji zostało użyte oprogramowanie Olympus analySIS FIVE.

III.6 Badania biochemiczne

Osoczowy poziom rozpuszczalnej frakcji adhezyny komórek naczyń typu 1 (*soluble vascular cell adhesion molecule-1* - sVCAM-1), interleukiny 6 (IL-6), interleukiny 12 (IL-12) i surowiczego amyloidu A (SAA) (wszystkie z R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [32, 128] oraz białka chemotaktycznego dla makrofagów (*macrophage chemotactic protein-1* - MCP-1) (BioSource, Camarillo, CA, USA) [114], oznaczano testem immunoenzymatycznym (ELISA).

III.7 Lipidy osocza

Całkowity osoczowy poziom cholesterolu i trójglicerydów, a także frakcji LDL i HDL cholesterolu, był oznaczany przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu (Roche Molecular Biochemical, Alameda, CA, USA).

III.8 Badanie rozkurczu naczyń

Funkcja śródbłonka naczyniowego oceniana była drogą pomiaru biodostępności tlenku azotu (NO). Biodostępność NO określano przy pomocy analizy zależnych od NO rozkurczów naczyniowych w łaźni narządowej (*"organ bath*"), stymulowanych podawaniem odpowiednich dawek acetylocholiny [63]. Badanie odbywało się przy użyciu multimiografu (Multimyograph model 610 M, Dania). Reakcje naczyniowe rejestrowane były w sposób ciągły na komputerze, dzięki programowi Acqknowledge 3.7.2 (przy pomocy systemu przetwarzania danych BIOPAC Systems, USA).

Naczynia wyizolowane ze zwierząt zostały dokładnie oczyszczone z otaczających tkanek: tłuszczowej i mięśniowej. Następnie zostały podzielone na pierścienie o szerokości 2-3 mm i umieszczone w łaźniach wypełnionych buforem
Krebsa - Henseleita (KHB) (120 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 2,5 mM CaCl₂; 25 mM NaHCO₃ oraz 5,5 mM glukozy) o temperaturze 37°C. Krążki naczyniowe zostały rozpięte pomiędzy stalowymi czujnikami tensometrów (cztery 5 ml łaźnie naczyniowe wypełnione buforem KH) i poddane stabilizacji przez okres 50-60 min. Pomiary dokonywane były jednocześnie w czterech krążkach naczyniowych – po dwa od każdego zwierzęcia. Uzyskane wyniki były następnie uśredniane.

Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były w obecności indometacyny (10 μ M). Miało to na celu wyeliminowanie potencjalnego wpływu prostaglandyn (w tym PGI₂) na rozkurcze w obrębie naczyń i dawało pewność, iż rozkurcze naczyń są efektem działania NO, a nie prostacykliny.

Po stabilizacji naczynia były pasywnie naprężane do napięcia podstawowego (7 mN dla tętnicy piersiowej wewnętrznej (IMA), pobranej od ludzi w trakcie zabiegów kardiochirurgicznych i 15 mN dla naczyń zwierzęcych) i kilkakrotnie przykurczane przez jednakowe stężenia KCl (90 mM), aż do uzyskania stabilnych odpowiedzi na KCl. Po kilkakrotnym wypłukaniu z KCl naczynia były przykurczane kumulatywnie wzrastającymi dawkami PGF_{2α} (10⁻⁹ M; 10⁻⁸ M; 10⁻⁷ M; 10⁻⁶ M; 10⁻⁵ M; 10⁻⁴ M). Właściwe doświadczenia odbywały się na naczyniach przykurczonych PGF_{2α}, w stopniu odpowiadającym 70-80% max. skurczu na PGF_{2α}. Na tak przykurczonych naczyniach testowane były odpowiedzi na acetylocholinę (Ach) stosowaną w kumulatywnie wzrastających dawkach.

III.9 Oznaczanie stężenia doksycykliny w surowicy myszy apoEknockout

Ze względu na to, że myszom podawano subkliniczne dawki dosycykliny, zmierzono poziom doksycykliny w surowicy u myszy karmionych tym lekiem.

1. przygotowanie próbek

Próbkę surowicy rozcieńczono wodą w stosunku 1:1 i odwirowano w probówkach Millipore z filtrem "*cut off*" 5 kDa (3 x 15 min / 14,9 rpm). Przefiltrowaną surowicę zakwaszono 10 µl 10% kwasu trifluorooctowego i poddano procedurze ekstrakcji na kolumnach Ultra Micro Spin Columns C-18 [122].

Ekstrakcja doksycykliny obejmowała następujące etapy:

- kondycjonowanie kolumny:

- 300 µl metanolu (wirowanie 2 min/3900 rpm)
- 300 µl wody (wirowanie 2 min/3900 rpm)

- nałożenie próbki (wirowanie 2 min/3900 rpm)

przemycie kolumny 3 x 300 µl 5% metanolu (po każdej porcji wirowanie 2 min/3900 rpm)

- ekstrakcja 2 x 200 μl 50% acetonitrylu (po każdej porcji wirowanie 2 min/3900 rpm)

Następnie próbki liofilizowano przez noc. Krzywą kalibracyjną przygotowano w sposób analogiczny, dodając przed rozcieńczeniem wodą odpowiednią ilość roztworu wzorca doksycykliny do surowicy kontrolnej. Liofilizaty rozpuszczono w 50 µl metanolu.

2. analiza przy pomocy połączenia spektrometrii mas z chromatografią cieczową (liquid chromatography – mass spectrometry: LC-MS)

Analizę próbek prowadzono za pomocą układu LC-MS (HPLC Agillent 1100, MS Applied- Biosystem).

Parametry rozdziału przy pomocy wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC):

- kolumna Hypersil BDS C18 (100 mm x 3 mm, 3 μm)
- fazy ruchome: A- 0,1% kwas mrówkowy w wodzie

B-0,1% kwas mrówkowy w acetonitrylu

- prędkość przepływu 0,2 ml/min,
- udział faz ruchomych: 60% A, 40% B, rozdział izokratyczny
- kolumna termostatowana, 40°C
- objętość nastrzyku 20 µl

Parametry spektrometrii mas (MS):

- potrójny kwadrupol
- źródło jonów- elektrosprej
- tryb jonizacji- pozytywna
- detekcja MRM: 445 → 428, energia kolizji 30
- temperatura 200°C, napięcie 5 kV

III.10 Analiza statystyczna

Wyniki zostały wyrażone jako średnia arytmetyczna ± SEM.

Ze względu na brak rozkładu normalnego większości parametrów miażdżycy, zostały użyte testy nieparametryczne. Najpierw test Kruskala-Wallisa został zastosowany do sprawdzenia istnienia różnic pomiędzy grupami. W przypadku stwierdzenia statystycznie znamiennych różnic, nieparametryczny test Manna-Whitneya był używany do analizy danych.

W przypadkach występowania rozkładu normalnego parametrów, stosowano najpierw analizę wariancji ANOVA, a następnie test *post hoc* Duncana.

W obu sytuacjach p<0,05 zostało uznane za statystycznie znamienne.

Obliczenia statystyczne zostały wykonane przy użyciu pakietu statystycznego Statistica 6 dla Windows (StatSoft, TX, USA).

IV. WYNIKI

IV.1 Lipidy

Doksycyklina nie zmieniła znamiennie poziomu cholesterolu i triglicerydów oraz profilu lipoproteinowego cholesterolu w osoczu badanych myszy (Tabela 1).

Tabela 1. Poziom całkowitego cholesterolu i triglicerydów w osoczu mysz	zy.
---	-----

lek	cholesterol całkowity (mmol/l) ± SEM	HDL-cholesterol (mmol/l) ± SEM	LDL-cholesterol (mmol/l) ± SEM	triglicerydy (mmol/l) ± SEM
kontrola	12,68 ± 0,3	$2,4 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,1$
doksycyklina	$11,3 \pm 0,3 \text{ (NS)}$	$2,2 \pm 0,25$ (NS)	$8,3 \pm 0,2 \text{ (NS)}$	$1,2 \pm 0,1 \text{ (NS)}$

NS - brak znamienności statystycznej w porównaniu z kontrolą

IV.2 Masa myszy

Masa myszy nie różniła się pomiędzy grupami (Tabela 2).

Tabela 2. Masa	ı myszy w	badanych	grupach.
----------------	-----------	----------	----------

lek	średnia masa ciała (g) ± SEM
kontrola	27,3 ± 0,3
doksycyklina	28,5 ± 0,3 (NS)

NS - brak znamienności statystycznej w porównaniu z kontrolą

IV.3 Stężenie doksycykliny w surowicy

Jeśli chodzi o stężenie dokscykliny w surowicach myszy, którym podawano ten lek, to wykryto stabilne poziomy doksycykliny (Tabela 3), które przy dawce 1,5 mg/ kg m.c. znakomicie korelowały z podanymi w piśmiennictwie stężeniami, przy podawaniu odpowiednio wyższych dawek (Tabela 4) [122]:

próbka (w dawce 1,5	Stężenie doksycykliny
mg/kg mc)	[ng/ml]
1	172,45
2	188,11
3	160,76

Tabela 3. Poziomy surowicze doksycykliny w grupie z podawanym lekiem.

Tabela 4. Poziomy surowicze doksycykliny po 5 tygodniach podawania leku w różnych dawkach, u myszy C57BL/6 [122]:

dawka [mg/kg mc]	stężenie doksycykliny [ng/ml]	
10	1400	
50	2700	
100	11900	

IV.4 Wielkość miażdżycy

Aorty różniły się stopniem miażdżycy pomiędzy grupą kontrolną a grupą, której podano lek.

Mierzony metodą "en face", procent całkowitej powierzchni aorty zajętej przez barwione Sudanem IV zmiany wynosił: w grupie kontrolnej 15,7 \pm 2,0%, podczas gdy w grupie traktowanej doksycykliną 10,25 \pm 1,7% (p<0,05) (ryc. 14, 15).

"Cross-section" korzeni aorty ujawnił również różnicę w powierzchni zmian miażdżycowych. Liczona w 8 kolejnych skrawkach średnia zmian \pm SEM, zajętych przez barwione ORO zmiany wynosiła: 90 687 \pm 8 521 μ m² w grupie kontrolnej przeciwko 66 254 \pm 7 468 μ m² w grupie otrzymujacej dosycyklinę (p<0,05) (ryc. 16, 17)

Zymografia *in situ* wykazała silny spadek całkowitej powierzchni aktywności żelatynaz u leczonych doksycykliną myszy (32 786 \pm 3 334 μ m²) w porównaniu do grupy kontrolnej (65 996 \pm 11 480 μ m², p<0,001) (ryc. 16, 18). Ponadto intensywność

fluorescencji była niższa w grupie poddanej leczeniu (77 \pm 15), w stosunku do myszy nieleczonych (132 \pm 32, p<0,05).



Ryc. 14. Reprezentatywne fotografie barwionych Sudanem IV aort "en face" z grup: kontrolnej i traktowanej lekiem myszy apoE - *knockout*. a- kontrola, b- doksycyklina Linia na rysunku "a" obrazuje 1 cm.



Ryc. 15. Powierzchnia zmian lipidowych w aorcie (wyrażona jako procent powierzchni całej aorty) u myszy apoE-knockout kontrolnych i leczonych doksycykliną (n=15 w każdej grupie). Wyniki są przedstawione jako średnia \pm SEM.



Ryc 16. Reprezentatywne mikrofotografie, ukazujące barwione czerwienią oleistą (*oil red-O*) zmiany miażdżycowe u myszy apoE-*knockout* (z lewej), oraz zieloną fluorescencję, ukazującą aktywność MMPs metodą zymografii *in situ* (z prawej) - w grupie kontrolnej oraz grupie leczonej doksycykliną (powiększenie × 80). Linia na rysunku obrazuje 500 μ m.



Ryc. 17. Wielkość zmian miażdżycowych w "korzeniu aorty", wyrażona w μm^2 , u barwionych ORO 6-miesięcznych myszy apoE-*knockout* kontrolnych i leczonych doksycykliną (n=15 w każdej grupie). Wyniki są przedstawione jako średnia ± SEM.



Ryc. 18. Wielkość aktywności żelatynaz, mierzona jako fluorescencja w "korzeniu aorty", wyrażona w μm^2 w zymografii *in situ*, u 6-miesięcznych myszy apoE-*knockout* kontrolnych i leczonych doksycykliną (n=15 w każdej grupie).

Wyniki są przedstawione jako średnia ± SEM. ***p<0,001 w stosunku do grupy kontrolnej

IV.5 Struktura blaszki i jej stabilność

Badano także zawartość makrofagów, jak również mięśniówki gładkiej w blaszkach miażdżycowych, jako wskaźniki stabilności blaszki. Stwierdzono, iż zawartość makrofagów (CD68) była obniżona w blaszkach, pochodzących od myszy leczonych doksycykliną (53% vs. 28%; p<0,05), podczas gdy zawartość komórek mięśni gładkich (α -aktyny) (6% vs. 17%; p<0,05) była zwiększona u leczonych myszy, w stosunku do grupy kontrolnej (n=15 w każdej grupie). Podsumowując, blaszki miażdżycowe u myszy traktowanych doksycykliną były bardziej stabilne niż u myszy kontrolnych (Tabela 5, ryc. 19, 20).

grupa	CD68 ± SEM	α-aktyna ± SEM	
	(% powierzchni)	(% powierzchni)	
kontrola	53 ± 7	6 ± 3	
leczone doksycykliną	28 ± 5 (p<0,05)	17 ± 4 (p<0,05)	

Tabela 5. Skład blaszki miażdżycowej w grupie kontrolnej i leczonej doksycykliną.



Ryc. 19. Skład blaszki miażdżycowej u 24-tygodniowych myszy, leczonych doksycykliną (b), w porównaniu do grupy kontrolnej (a). Immunohistochemiczne barwienie na marker makrofagów CD68 (na zielono) (wszystko w powiększeniu × 80).



Ryc. 20. Skład blaszki miażdżycowej u 24-tygodniowych myszy, leczonych doksycykliną (b), w porównaniu do grupy kontrolnej (a).

Immunohistochemiczne barwienie na α -aktynę mięśni gładkich (na pomarańczowo) (wszystko w powiększeniu × 80).

IV.6 Osoczowe markery zapalenia

Jeśli chodzi o poziomy osoczowe sVCAM-1, to wartości w grupie z doksycykliną nie różniły się statystycznie znamiennie od grupy kontrolnej, choć wykazywały tendencję spadkową (Ryc. 21).



Ryc. 21. Poziom sVCAM-1 w osoczu w badanych grupach.



Ryc. 22. Poziom MCP-1 w osoczu w badanych grupach. *p<0,05 w stosunku do grupy kontrolnej



Ryc. 23. Poziom IL-6 w osoczu w badanych grupach.



Ryc. 24. Poziom IL-12 w osoczu w badanych grupach.



Ryc. 25. Poziom SAA w osoczu w badanych grupach.

Również poziomy osoczowe MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA, w grupach leczonych doksycykliną, nie różniły się statystycznie znamiennie od grupy kontrolnej, z lekko wyrażoną jednak tendencją spadkową (ryc. 22-25).

IV.7 Rozkurcz naczyń

Badając rozkurcz naczyń zależny od tlenku azotu okazało się, że kontrola myszy apoE-*knockout* nie wykazywała cech dysfunkcji śródbłonka. Przebieg krzywej dla doksycykliny był podobny i nie wykazał różnic statystycznie znamiennych w stosunku do krzywej kontrolnej (ryc. 26).



Ryc. 26. NO-zależne izometryczne rozkurcze pierścieni aortalnych myszy apoE – *knockout*, wstępnie przykurczanych $PGF_{2\alpha}$, jako reakcja na podanie wzrastających stężeń acetylocholiny (od 1×10^{-9} do 1×10^{-5} M).

Wykres niebieski prezentuje rozkurcze naczyń u myszy apoE - knockout leczonych doksycykliną (n=6), wykres czerwony – rozkurcze u myszy apoE - knockout kontrolnych (n=6). Rozkurcze przedstawiono jako % wstępnego skurczu.

Poszczególne punkty wykresu stanowią średni rozkurcz dla danej dawki dla każdego naczynia.

V. DYSKUSJA

Skład macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) wpływa na progresję blaszki miażdżycowej. Metaloproteinazy macierzy komórkowej (MMPs) są grupą endopeptydaz, posiadających zdolność do rozcinania szeregu komponent macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), takich jak: kolagen, elastyna, żelatyna czy kazeina.

Zmiany ECM indukowane przez MMPs zależą od szeregu czynników [5]:

Po pierwsze, w dodatku do produkcji MMP poprzez poszczególne struktury ściany naczyniowej – jak komórki śródbłonka i komórki mięśniówki gładkiej, infiltracja komórek zapalnych do zmian miażdżycowych powoduje znaczne zwiększenie aktywności MMP.

Po drugie, MMPs są podzielone na różne grupy, w zależności od tego jaką komponentę ECM degradują, zatem profil MMPs ekspresjonowanych w obrębie zmiany miażdżycowej ma konsekwencje dla składu ECM.

Po trzecie, chociaż część MMPs jest ekspresjonowana konstytutywnie, inne są wysoce zależne od regulacji transkrypcyjnej dla ich ekspresji. Większość MMPs jest wydzielana w formie "uśpionej" proformy, wymagającej aktywacji poprzez czynniki proteolityczne.

W opisanym powyżej eksperymencie wykazano po raz pierwszy, że doksycyklina w dawkach subterapeutycznych – jako inhibitor MMPs - hamuje rozwój miażdżycy w eksperymentalnym modelu miażdżycy: myszy apoE-*knockout* [113]. Wykazano ponadto, że doksycyklina zwiększa stabilność blaszki miażdżycowej. Jednocześnie stwierdzono wysoce znamienny statystycznie spadek aktywności żelatynaz (MMP-2 i MMP-9) u traktowanych doksycykliną myszy. Ani poziom całkowity osoczowego cholesterolu i trójglicerydów, ani profil lipoproteinowy cholesterolu nie zmieniły się pod wpływem leku. Jest to cenna informacja, gdyż daje ona pewność, iż działanie przeciwmiażdżycowe nie jest związane z obniżeniem poziomu cholesterolu i trójglicerydów, czy też ze zmianą profilu lipoproteinowego cholesterolu. Także masa myszy nie zmieniła się w trakcie trwania eksperymentu.

Jeśli chodzi o osoczowe markery zapalenia, to sVCAM-1, MCP-1 [1, 62], IL-6, IL-12 oraz SAA nie były hamowane statystycznie znamiennie przez lek, choć wykazywały tendencję do spadku pod jego wpływem.

Wyniki "organ bath" wykazały brak dysfunkcji śródbłonka u karmionych dietą *chow* myszy apoE-*knockout*. Zatem doksycyklina nie mogła w tym wypadku poprawić działania endotelium. Wynik ten jednak rzuca nowe światło na niejednoznaczne w tej materii piśmiennictwo [57, 174]. Część doniesień bowiem potwierdza brak dysfunkcji śródbłonka u myszy apoE-*knockout* [13, 83, 165], szczególnie gdy nie są one karmione dietą wysokocholesterolową [37, 40, 41, 85, 86, 154, 173].

Już od pewnego czasu znano rolę, jaką odgrywają MMPs w rozwoju miażdżycy [5, 9, 10, 51, 81, 170]. Mniej więcej od roku 2000 zaczęto wskazywać na MMPs, jako potencjalny cel terapeutyczny w hamowaniu rozwoju miażdżycy [3, 55, 145]. W badaniach na podwójnie znokautowanych myszach miażdżycowych wykazano, że usunięcie MMPs prowadzi do zmniejszenia ilości miażdżycy [38, 84, 91]. Jednakże leki hamujące MMPs nie były dotąd badane pod kątem działania na proces miażdżycowy.

Wskazywano szczególnie na żelatynazy: MMP-2 i MMP-9 [116, 127] jako potencjalny cel terapeutyczny w chorobach układu sercowo-naczyniowego [27]. Między innymi proponowano leczenie tętniaków aorty doksycykliną [7, 162]. Spekulowano również, że inhibitory MMPs mogłyby także znaleźć zastosowanie w leczeniu pacjentów po zawale serca – jako prewencja pozawałowej niewydolności serca [30].

Doksycyklina w subantybakteryjnych dawkach hamuje MMPs. Ponadto jest to jedyny, jak dotąd, inhibitor MMPs stosowany klinicznie [59, 140].

Wyniki publikowane dotychczas w powyższym temacie są dość rozbieżne. Przykładowo, w roku 2003 Manning *i wsp.* wykazał brak efektu doksycykliny u myszy LDL receptor - *knockout*, poddanych wlewowi angiotensyny II [94]. Jednakże warunki tego eksperymentu były bardzo odległe od prezentowanego w niniejszej pracy.

Z drugiej strony, doksycyklina dowiodła swojej skuteczności w szczurzym modelu tętniaka aorty [31, 175]. Castro *i wsp.* wykazali z kolei w 2008 roku, że hamowanie funkcji MMPs przez doksycyklinę u szczurów nadciśnieniowych obniża ciśnienie tętnicze i zapobiega dysfunkcji naczyniowej [22].

W dużym badaniu klinicznym wskazano na hamowanie przez doksycyklinę MMP-1 w obrębie blaszek miażdżycowych w tętnicach szyjnych [2].

Wreszcie w serii eksperymentów wykonanych w 2007 roku przez Madana *i wsp.* wykazano pozytywny wpływ doksycykliny na aterogenezę w specjalnym modelu heterozygotycznych myszy apoE-*knockout*, zakażonych *Porphyromonas gingivalis* [92].

Podsumowując, koncepcja metaloproteinaz macierzy komórkowej, a szczególnie żelatynaz, jako istotnego celu klinicznego wydaje się być obiecująca, jednakże jest jeszcze wciąż daleka droga do jednoznacznego ustalenia warunków, w jakich ten rodzaj leczenia mógłby odnieść u ludzi największe korzyści [9, 48, 51, 170].

Dane przedstawione w niniejszej pracy wykazują działanie przeciwmiażdżycowe doksycykliny. Możnaby zatem spekulować, że użycie doksycykliny w dawkach niższych od przeciwbakteryjnych oferowałoby także u ludzi specjalne korzyści w profilaktyce/leczeniu choroby niedokrwiennej serca [176]. Jednakże musiałoby to zostać potwierdzone w dużych badaniach klinicznych.

VI. WNIOSKI

1. Na eksperymentalnym modelu miażdżycy: myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E (apoE–*knockout*), doksycyklina w dawkach subterapeutycznych (w stosunku do działania chemioterapeutycznego) hamuje aterogenezę, nie zmieniając przy tym poziomu cholesterolu i triglicerydów oraz profilu lipoproteinowego cholesterolu w osoczu.

2. Pod wpływem doksycykliny hamowana jest aktywność metaloproteinaz macierzy komórkowej, szczególnie typu 2 i 9 (żelatynazy), co wykazuje zymografia *in situ*.

3. Następuje również korzystna przebudowa blaszki miażdżycowej w kierunku większej stabilności – mniej makrofagów, a więcej komórek mięśniówki gładkiej naczyń.

4. Wskaźniki zapalne: MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA nie są hamowane w stopniu statystycznie znamiennym, choć wykazują lekką tendencję spadkową pod wpływem doksycykliny.

5. Pomimo, że myszy apoE-*knockout* karmione dietą niskocholesterolową nie wykazują dysfunkcji śródbłonka, stanowią jednak doskonały model eksperymentalny do badania wpływu leków na hamowanie miażdżycy.

VII. STRESZCZENIE

Ostatnie badania wykazują duży wpływ metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs) w tworzeniu się blaszki miażdżycowej.

Hipoteza robocza niniejszej pracy zakładała, że doksycyklina w dawkach subterapeutycznych (w stosunku do działania chemioterapeutycznego) - bloker MMPs - może hamować rozwój zmian miażdżycowych. Badania prowadzone były na najnowszym modelu zwierzęcym miażdżycy: myszach z wyłączonym genem dla apolipoproteiny E (myszy apoE-*knockout*).

Poddano badaniu trzydzieści samic myszy apoE-*knockout* w wieku 8 tygodni (podzielonych na dwie grupy o liczebności n=15), o podłożu genetycznym C57BL/6J. Oprócz grupy kontrolnej, grupa eksperymentalna otrzymywała tę samą dietę, zmieszaną z doksycykliną w dawce 1,5 mg/ kg m.c./ dobę.

W wieku 6 miesięcy wszystkie myszy poddano eutanazji i pobrano od nich osocze, serca i wypreparowane aorty.

Aorty różniły się stopniem miażdżycy pomiędzy grupą kontrolną a grupą, której podano lek. Mierzony metodą "en face", procent całkowitej powierzchni aorty zajętej przez barwione Sudanem IV zmiany wynosił: w grupie kontrolnej $15,7 \pm 2,0\%$, podczas gdy w grupie traktowanej doksycykliną $10,25 \pm 1,7\%$ (p<0,05).

"Cross-section" korzeni aorty ujawnił również różnicę w powierzchni zmian miażdżycowych. Liczona w 8 kolejnych skrawkach średnia zmian \pm SEM, zajętych przez barwione ORO zmiany wynosiła: 90 687 \pm 8 521 μ m² w grupie kontrolnej przeciwko 66 254 \pm 7 468 μ m² w grupie otrzymujacej dosycyklinę (p<0,05).

Zymografia *in situ* wykazała równoczesny silny spadek całkowitej powierzchni aktywności żelatynaz u myszy leczonych doksycykliną (32 786 ± 3 334 μ m²) w porównaniu do grupy kontrolnej (65 996 ± 11 480 μ m², p<0,001).

Doksycyklina nie zmieniła w sposób statystycznie znamienny profilu lipipoproteinowego cholesterolu w osoczu oraz całkowitego poziomu cholesterolu i trójglicerydów. Wskaźniki zapalenia: sVCAM-1, MCP-1, IL-6, IL-12 oraz SAA wykazywały lekką tendencję do spadku pod wpływem tego leku, nie osiągając jednak znamienności statystycznej. Metodą "organ bath" nie wykazano dysfunkcji śródbłonka u badanych myszy.

Niniejsze badanie jest pierwszym doniesieniem, w którym wykazano na najnowszym eksperymentalnym modelu zwierzęcym miażdżycy pozytywny efekt farmakologicznego podawania subklinicznych dawek doksycykliny na proces aterogenezy.

VIII. SUMMARY

Doxycycline at subantimicrobial doses inhibits matrix metalloproteinases (MMPs) activity, and is the only MMPs inhibitor which is widely available in clinical practice.

The aim of the study was to reveal whether non-specific MMPs inhibition by tetracycline could ameliorate development of atherosclerosis in apolipoprotein E (apoE)-knockout mice.

30 female 8-week-old apoE–knockout mice (in each group n=15) on background C57BL/6J, were studied. Experimental groups received the same diet as control, mixed with doxycycline in a dose of 1.5 mg/ kg b.w./ day. Cholesterol profile was not changed by the drug.

Doxycycline (1.5 mg/ kg b.w./ day) attenuated atherogenesis, measured both by "en face" method (10.25 \pm 1.7% vs. 15.7 \pm 2.0%, p<0.05) and "cross-section" method (66 254 \pm 7 468 μ m² vs. 90 687 \pm 8 521 μ m², p<0.05). *In-situ* zymography showed marked decrease of the extent of non-specific gelatinase activity in doxycycline-treated mice (65 996 \pm 11 480 μ m², p<0.001).

Inflammatory indicators: sVCAM-1, MCP-1, IL-6, IL-12 as well as SAA had tendency to decrease after doxycycline, however, they did not reach statistical significance. Organ bath did not show any endothelial dysfunction in experimental mice.

To our knowledge, this is the first report that shows the effect of doxycycline on atherogenesis in apoE–*knockout* mice.

IX. PIŚMIENNICTWO

1. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1518-1525.

2. Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke* 2002; 33: 2858-2864.

3. Aziz F, Kuivaniemi H. Role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg* 2007; 21: 392-401.

4. Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost* 2001; 86: 356-365.

5. Bäck M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2010; 52: 410-428.

6. Baglione J, Smith JD. Quantitative assay for mouse atherosclerosis in the aortic root. *Methods Mol Med* 2006; 129: 83-95.

7. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2008; 117: 1883-1889.

8. Bea F, Kreuzer J, Preusch M, Schaab S, Isermann B, Rosenfeld ME, Katus H, Blessing E. Melagatran reduces advanced atherosclerotic lesion size and may promote plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2787-2792.

9. Beaudeux JL, Giral P, Brukert E. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects. *Ann Biol Clin* 2003; 61: 147-158.

10. Beaudeux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 121-131.

11. Beyzade S, Zhang S, Wong YK, Day IN, Eriksson P, Ye S. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2130-2137.

12. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579-1585.

13. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2333-

2340.

14. Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severly affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 1998; 101: 2658-2664.

15. Breslow JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 8314.

16. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92 kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. *Circulation* 1995; 91: 2125-2131.

17. Caird J, Napoli C, Taggart C, Farrell M, Bouchier-Hayes D. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms. *Eur J Neurol* 2006; 13: 1098-1105.

18. Caligiuri G, Levy B, Pernow J, Thoren P, Hansson GK. Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6920-6924.

19. Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou X, Tornberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999; 145: 301-308.

20. Capecchi MR. Generating mice with targeted mutations. *Nature Med* 2001; 7: 1086-1090.

21. Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 8-33.

22. Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2008; 198: 320-331.

23. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F905-911.

24. Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. *J Biomed Sci* 2010; 17: 10.

25 Chien KR. Genes and physiology: molecular physiology in genetically engineered animals. In: Perspectives series: molecular medicine in genetically engineered animals. *J Clin Invest* 1996; 97: 901-909.

26. Choi ET, Collins ET, Marine LA, Uberti MG, Uchida H, Leidenfrost JE, Khan MF, Boc KP, Abendschein DR, Parks WC. Matrix metalloproteinase-9 modulation by resident arterial cells is responsible for injury-induced accelerated atherosclerotic plaque

development in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 1020-1025.

27. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 189-205.

28. Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2001; 60 Suppl 3: iii62-7.

29. Crauwels HM, Van Hove CE, Holvoet P, Herman AG, Bult H. Plaque-associated endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice on a regular diet. Effect of human apolipoprotein AI. *Cardiovasc Res* 2003;59: 189-199.

30. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; 89: 201-210.

31. Curci JA, Petrinec D, Liao S, Golub LM, Thompson RW. Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J Vasc Surg* 1998; 28: 1082-1093.

32. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1255-1262.

33. Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. Am J Med Sci 2002; 323: 3-10.

34. Daugherty A, Rateri DL. T lymphocytes in atherosclerosis. The Yin-Yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ Res* 2002; 90: 1039-1040.

35. Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods* 2005; 36: 129-138.

36. Daugherty A, Whitman SC. Quantification of atherosclerosis in mice. *Methods Mol Biol* 2003; 209: 293-309.

37. Deckert V, Lizard G, Duverger N, Athias A, Palleau V, Emmanuel F, Moisant M, Gambert P, Lallemant C, Lagrost L. Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in ApoE-deficient mice: toward normalization by human ApoA-I expression. *Circulation* 1999; 100: 1230-1235.

38. Deguchi JO, Aikawa E, Libby P, Vachon JR, Inada M, Krane SM, Whittaker P, Aikawa M. Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation* 2005; 112: 2708-2715.

39. Dembińska-Kieć A, Kawecka-Jaszcz K, Kwaśniak M, Guevara I, Pankiewicz J, Malczewska-Malec M, Iwanejko J, Hartwich J, Zdzienicka A, Stochmal A, Leszczyńska-Gołąbek I. Apo E isoforms, insulin output and plasma lipid levels in essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 95-99.

40. d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1017-1022.

41. d'Uscio LV, Smith LA, Katusic ZS. Hypercholesterolemia impairs endotheliumdependent relaxations in common carotid arteries of apolipoprotein e-deficient mice. Stroke 2001; 32: 2658-2664.

42. Eckart RE, Uyehara CF, Shry EA, Furgerson JL, Krasuski RA. Matrix metalloproteinases in patients with myocardial infarction and percutaneous revascularization. *J Interv Cardiol* 2004; 17: 27-31.

43. Elhage R, Jawień J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E – knockout mice. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 234-240.

44. Elhage R, Gourdy P, Jawień J, Brouchet L, Castano C, Fievet C, Hansson GK, Arnal JF, Bayard F. The atheroprotective effect of 17β -estradiol depends on complex interactions in adaptive immunity. *Am J Pathol* 2005; 167: 267-274.

45. Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res* 1998; 83: 270-278.

46. Fazio S, Lee YL, Ji ZS, Rall SC Jr. Type III hyperlipoproteinemic phenotype in transgenic mice expressing dysfunctional apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1993; 92: 1497-1503.

47. Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M, Bertazzoni G, Gazzaniga PP, Alessandri C. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. *J Investig Med* 2003; 51: 295-300.

48. Fingleton B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 333-346.

49. Fiotti N, Altamura N, Orlando C, Simi L, Reimers B, Pascotto P, Zingone B, Pascotto A, Serio M, Guarnieri G, Giansante C. Metalloproteinases-2, -9 and TIMP-1 expression in stable and unstable coronary plaques undergoing PCI. *Int J Cardiol* 2008; 127: 350-357.

50. Fredrikson GN, Soderberg I, Lindholm M, Dimayuga P, Chyu KY, Shah PK, Nilsson J. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 879-884.

51. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-262.

52. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-2503.

53. Gapski R, Hasturk H, Van Dyke TE, Oringer RJ, Wang S, Braun TM, Giannobile WV. Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 149-156.

54. Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 103-112.

55. George SJ. Therapeutic potential of matrix metalloproteinase inhibitors in atherosclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9: 993-1007.

56. Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1334-1347.

57. Gödecke A, Ziegler M, Ding Z, Schrader J. Endothelial dysfunction of coronary resistance vessels in apoE-/- mice involves NO but not prostacyclin-dependent mechanisms. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 253-262.

58. Goldstein JL. Laskers for 2001: knockout mice and test-tube babies. *Nat Med* 2001; 7: 1079-1080.

59. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998; 12: 12-26.

60. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 59-69.

61. Groblewska M, Mroczko B, Szmitkowski M. [The role of selected matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer development]. *Postepy Hig Med Dosw* (Online) 2010; 64: 22-30.

62. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998; 2: 275-281.

63. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 2002; 39: 1088-1094.

64. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890.

65. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-291.

66. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New Engl J Med* 2005; 352: 1685-1695.

67. Hemmings FJ, Farhan M, Rowland J, Banken L, Jain R. Tolerability and pharmacokinetics of the collagenase-selective inhibitor Trocade in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 2001; 40: 537-543.

68. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, Golub LM, van Hinsbergh VW. Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res* 1998; 12: 114-118.

69. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries SE. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8154-8158.

70. Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2001; 141: 211-217.

71. Ishibashi S, Bown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 92: 883-893.

72. Jawień J. Badania nad wykorzystaniem myszy z wyłączonymi genami dla apolipoproteiny E oraz receptora LDL jako modelu eksperymentalnego w hamowaniu procesu miażdżycowego. Rozprawa habilitacyjna. *Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego*. Kraków 2006.

73. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 503-517.

74. Jawień J, Gajda M, Mateuszuk Ł, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, Korabiowska M, Korbut R. Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates artherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 483-9.

75. Jawień J, Gajda M, Rudling M, Mateuszuk Ł, Olszanecki R, Guzik T, Cichocki T, Chłopicki S, Korbut R. Inhibition of five lipoxygenase activating protein (FLAP) by MK-886 decreases atherosclerosis in apoE/LDLR – double knockout mice. *Eur J Clin Invest* 2006; 36 ; 141-146.

76. Jawień J, Csanyi G, Gajda M, Mateuszuk L, Łomnicka M, Korbut R, Chłopicki S. Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur J Pharmacol* 2007; 556: 129-135.

77. Jawień J, Gajda M, Olszanecki R, Korbut R. BAYx1005 attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 583-538.

78. Jawień J, Gajda M, Wolkow PP, Żurańska J, Olszanecki R, Korbut R. The effect of montelukast on atherogenesis in apoE/LDLR – double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59: 633-639.

79. Jiang J, Valen G, Tokuno S, Thoren P, Pernow J. Endothelial dysfunction in atherosclerotic mice: improved relaxation by combined supplementation with L-arginine-tetrahydrobiopterin and enhanced vasoconstriction by endothelin. *Br J Pharmacol* 2000; 131: 1255-1261.

79. Johansson ME, Hägg U, Wikström J, Wickman A, Bergström G, Gan LM. Haemodynamically significant plaque formation and regional endothelial dysfunction in cholesterol-fed ApoE-/- mice. *Clin Sci* (Lond) 2005; 108: 531-538.

80. Johnson JL, Baker AH, Oka K, Chan L, Newby AC, Jackson CL, George SJ. Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* 2006; 113: 2435-2444.

81. Johnson JL, Fritsche-Danielson R, Behrendt M, Westin-Eriksson A, Wennbo H, Herslof M, Elebring M, George SJ, McPheat WL, Jackson CL. Effect of broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition on atherosclerotic plaque stability. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 586-595.

82. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138.

83. Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: H1679-1685.

84. Kuzuya M, Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Itohara S, Iguchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1120-1125.

85. Lamping KG, Nuno DW, Chappell DA, Faraci FM. Agonist-specific impairment of coronary vascular function in genetically altered, hyperlipidemic mice. *Am J Physiol* 1999; 276: R1023-1029.

86. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-1288.

87. Lemaître V, O'Byrne TK, Borczuk AC, Okada Y, Tall AR, D'Armiento J. ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1227-1234.

88. Lemaître V, Soloway PD, D'Armiento J. Increased medial degradation with pseudoaneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Circulation* 2003; 107: 333-338.

89. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002; 8: 1257-1262.

90. Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature 2000; 407: 233-241.

91. Luttun A, Lutgens E, Manderveld A, Maris K, Collen D, Carmeliet P, Moons L. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* 2004; 109: 1408-1414.

92. Madan M, Bishayi B, Hoge M, Messas E, Amar S. Doxycycline affects diet- and bacteria-associated atherosclerosis in an ApoE heterozygote murine model: cytokine profiling implications. Atherosclerosis 2007; 190: 62-72.

93. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1998; 240: 622-630.

94. Manning MW, Cassis LA, Daugherty A. Differential effects of doxycycline, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, on angiotensin II-induced atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 483-488.

95. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E – deficient mouse. A decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1006-1014.

96. Michajlik A, Bartniowska E. *Lipidy i lipoproteiny osocza*. Wydanie I, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa; 1999: 70-73.

97. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci* 2002; 70: 855-865.

98. Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349: 1269-1276.

99. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE – deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 133-140.

100. Napoli C, Palinski W, Di Minno G, D'Armiento FP. Determination of atherogenesis in apolipoprotein E – knockout mice. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000; 10: 209-215.

101. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2108-2114.

102. Nicoletti A, Kaveri S, Caligiuri G, Bariety J, Hansson GK. Immunoglobulin treatment reduces atherosclerosis in apoE knockout mice. *J Clin Invest* 1998; 102: 910-918.

103. Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, Zhou X, Hansson GK. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Mol Med* 2000; 6: 283-290.

104. Ohshima S, Petrov A, Fujimoto S, Zhou J, Azure M, Edwards DS, Murohara T, Narula N, Tsimikas S, Narula J. Molecular imaging of matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic plaques of mice deficient in apolipoprotein e or low-density-lipoprotein receptor. *J Nucl Med* 2009; 50: 612-617.

105. O'Neill TP. Apolipoprotein E-deficient mouse model of human atherosclerosis. *Toxicol Pathol* 1997; 25: 20-21.

106. Orchard J, Massey A, Brown R, Cardon-Dunbar A, Hofmann J. Successful management of tendinopathy with injections of the MMP-inhibitor aprotinin. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466: 1625-1632.

107. Osada J, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 25-29.

108. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-40.

109. Paigen B, Plump AS, Rubin EM. The mouse as a model for human cardiovascular disease and hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5: 258-264.

110. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE – deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation – specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde – lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 605-616.

111. Paulsson G, Zhou X, Tornquist E, Hansson GK. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E – deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 10-17.

112. Pawlak K, Pawlak D, Myśliwiec M. Urokinase-type plasminogen activator and metalloproteinase-2 are independently related to the carotid atherosclerosis in haemodialysis patients. *Thromb Res* 2008; 121: 543-548.

113. Pawłowska M, Gajda M, Pyka-Fościak G, Totoń-Żurańska G, Niepsuj A, Kuś K, Bujak-Giżycka B, Suski M, Olszanecki R, Jawień J, Korbut R. The effect of doxycycline on atherogenesis in apoE – knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 2011 [in press].

114. Peluzio MCG, Miguel E Jr, Drumond TC, Cesar GC, Santiago HC, Teixeira MM, Vieira EC, Arantes RME, Alvarez-Leite JI. Monocyte chemoattractant protein-1

involvement in the α -tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Br J Nutr* 2003; 90: 3-11.

115. Pentikäinen MO, Öörni K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL-trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med* 2000; 247: 359-370.

116. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 677-687.

117. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 4471-4475.

118. Plump AS, Smith JD, Hayek T Aalto-Setala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E – deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: 343-353.

119. Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr* 1995; 15: 495-518.

120. Plump A. Atherosclerosis and the mouse: a decade of experience. *Ann Med* 1997; 29: 193-198

121. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsson J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Koivula T, Lehtimäki T. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1446-1450.

122. Prall AK, Longo GM, Mayhan WG, Waltke EA, Fleckten B, Thompson RW, Baxter BT. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. *J Vasc Surg* 2002; 35: 923-929.

123. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1349-1357.

124. Purcell-Huynh DA, Farese RV Jr, Johnson DF, Flynn LM, Pierotti V, Newland DL, Linton MF, Sanan DA, Young SG. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high – fat diet. *J Clin Invest* 1995; 95: 2246-2257.

125. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000; 105: 1641-1649.

126. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008; 451: 904-913.

127. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 346-359.

128. Ramos CL, Huo Y, Jung U, Ghosh S, Manka DR, Sarembock IJ, Ley K. Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1 – dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E – deficient mice. *Circ Res* 1999; 84: 1237-1244.

129. Reardon CA, Getz GS. Mouse models of atherosclerosis. *Curr Opin Lipid* 2001; 12: 167-173.

130. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 141-147.

131. Robbins J. Gene targeting. The precise manipulation of the mammalian genome. *Circ Res* 1993; 73: 3-9.

132. Rogowicz A, Zozulińska D, Wierusz-Wysocka B. [The role of matrix metalloproteinases in the development of vascular complications of diabetes mellitus--clinical implications]. *Pol Arch Med Wewn* 2007; 117: 43-48.

133. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976; 295: 369-377.

134. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977; 86: 675-84.

135. Ross R, Faggiotto A, Bowen-Pope D, Raines E. The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis. *Circulation* 1984; 70: 77-82.

136. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *New Engl J Med* 1986; 314: 488-500.

137. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New Eng J Med* 1999; 340: 115-126.

138. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. Am Heart J 1999; 138: S419-S420.

139. Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, Emmanuel F, Caillaud JM, Laplaud PM, Dachet C, Chapman MJ. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 100: 533-540.

140. Ryan ME, Ashley RA. How do tetracyclines work? Adv Dent Res 1998; 12: 149-151.
141. Savla U. At the heart of atherosclerosis. Nature Med 2002; 8: 1209.

142. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389.

143. Shi W, Brown MD, Wang X, Wong J, Kallmes DF, Matsumoto AH, Helm GA, Drake TA, Lusis AJ. Genetic backgrounds but not sizes of atherosclerotic lesions determine medial destruction in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1901-1906.

144. Shishehbor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 131-139.

145. Sierevogel MJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Strauss BH. Matrix metalloproteinases: a therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1033-1040.

146. Silence J, Lupu F, Collen D, Lijnen HR. Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1440-1445.

147. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90: 520-530.

148. Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 225-238.

149. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 840-856.

150. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1512-1531.

151. Stein Y, Stein O. Does therapeutic intervention achieve slowing of progression or bona fide regression of atherosclerotic lesions? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 183-188.

152. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med* 2002; 8: 1211-1217.

153. Steinmetz EF, Buckley C, Shames ML, Ennis TL, Vanvickle-Chavez SJ, Mao D, Goeddel LA, Hawkins CJ, Thompson RW. Treatment with simvastatin suppresses the

development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg* 2005; 241: 92-101.

154. Steioff K, Rütten H, Busch AE, Plettenburg O, Ivashchenko Y, Löhn M. Long term Rho-kinase inhibition ameliorates endothelial dysfunction in LDL-Receptor deficient mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 512: 247-249.

155. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3893-3897.

156. Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 2006; 37: 1923-1932.

157. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386: 292-296.

158. Szafran H, Knapik-Czajka M. Podstawy biochemiczne gospodarki lipidowej organizmu człowieka. Collegium Medicum UJ, Kraków; 1994:23-24.

159. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor – deficient and apolipoprotein E – deficient mice. *J Lipid Res* 1995; 36: 2320-2328.

160. Tenger C, Sudenborg A, Jawień J, Zhou X. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 791-796.

161. Thom DH, Wang SP, Grayston JT, Siscovick DS, Stewart DK, Kronmal RA, Weiss NS. Chlamydia pneumoniae strain TWAR antibody and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 547-551.

162. Turner GH, Olzinski AR, Bernard RE, Aravindhan K, Karr HW, Mirabile RC, Willette RN, Gough PJ, Jucker BM. In vivo serial assessment of aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice via MRI. *Circ Cardiovasc Imaging* 2008; 1: 220-226.

163. Undas A, Szczeklik A. Miażdżyca. W: *Kardiologia*. Pod redakcją A. Szczeklika i M. Tendery. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 2009, wyd. I, tom I, str. 321-328.

164. van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, Wieringa B, Frants RR, Havekes LM, Hofker MH. Variability in cholesterol content in serum and aortic tissue in apolipoprotein E-deficient mice is comparable in inbred (129/Sv) and outbred (mixed 129/Sv and C57BL/6) mice. *Atherosclerosis* 1995; 118: 165-167.

165. Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine JP. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res* 2003; 40: 87-96.

166. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G, Schulz R. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; 106: 1543-1549.

167. Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol* 2005; 167: 1429-1442.

168. Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y, Chopp M. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci* 2006; 26: 5996-6003.

169. Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1503-1509.

170. Watanabe N, Ikeda U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6: 112-120.

171. White SJ and Newby AC. Metalloproteinases, the endothelium, and atherosclerosis. In: Atherosclerosis. Molecular and Cellular Mechanism. Edited by SJ George and J Johnson. pp:157-172.

172. Wybrańska I, Kwaśniak M. Biochemia kliniczna i diagnostyka zaburzeń gospodarki lipidowej. W: *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.* Pod redakcją: Aldony Dembińskiej-Kieć i Jerzego W. Naskalskiego. Wydanie II, Wydawnictwo Urban & Partner, Wrocław; 2002: 329-387.

173. Yaghoubi M, Oliver-Krasinski J, Cayatte AJ, Cohen RA. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 751-757.

174. Yang R, Powell-Braxton L, Ogaoawara AK, Dybdal N, Bunting S, Ohneda O, Jin H. Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2762-2768.

175. Zelaszczyk D, Kozlowska H, Baranowska U, Baranowska M, Reutelsterz A, Kiec-Kononowicz K, Malinowska B, Schlicker E. Four close bupranolol analogues are antagonists at the low-affinity state of beta1-adrenoceptors. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 51-60.

176. Zeng B, Prasan A, Fung KC, Solanki V, Bruce D, Freedman SB, Brieger D. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. *Intern Med J* 2005; 35: 331-335.

177. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahitta A, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258: 468-471.

178. Zhang Y, Naggar JC, Welzig CM, Beasley D, Moulton KS, Park HJ, Galper JB. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1764-1771.

X. SPIS TABEL

Tabela 1. Poziom całkowitego cholesterolu i triglicerydów w osoczu myszy.

Tabela 2. Masa myszy w badanych grupach.

Tabela 3. Poziomy surowicze doksycykliny w grupie z podawanym lekiem.

Tabela 4. Poziomy surowicze doksycykliny po 5 tygodniach podawania leku w różnych dawkach, u myszy C57BL/6.

Tabela 5. Skład blaszki miażdżycowej w grupie kontrolnej i leczonej doksycykliną.

XI. SPIS RYCIN

Ryc. 1. Klasyczna struktura domenowa metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (MMPs).

Ryc. 2. Wzór chemiczny doksycykliny.

Ryc. 3. Odsłonięty łuk aorty.

Ryc. 4. Cała aorta wypreparowana.

Ryc. 5. Aorta rozpięta na płytce woskowej, gotowa do barwienia.

Ryc. 6. Krojenie poprzeczne serca skalpelem.

Ryc. 7. Schemat krojenia poprzecznego serca myszy skalpelem, przed zatopieniem w OCT.

Ryc. 8. Przecięte serce zanurzone w żelu OCT w plastykowej foremce.

Ryc. 9. Schemat obrazujący trudności związane z uzyskaniem w kriostacie cięcia poprzecznego, prostopadłego do osi aorty.

Ryc. 10. Krojenie mięśnia serca w kriostacie, idąc płaszczyzną ostrza kriostatu w górę, w kierunku "korzenia aorty".

Ryc. 11. Obraz kolejnych sekcji poprzecznych "korzenia aorty" co 100 μm, licząc od "punktu zero", w którym podczas cięcia pojawia się pierwszy płatek.

Ryc. 12. Komputerowa ocena wielkości miażdżycy w przekroju poprzecznym "korzenia aorty".

Ryc. 13. Komputerowa ocena procentowej wielkości miażdżycy w przekroju wzdłużnym aorty.

Ryc. 14. Reprezentatywne fotografie barwionych Sudanem IV aort "en face" z grup: kontrolnej i traktowanej lekiem myszy apoE - *knockout*.

Ryc. 15. Powierzchnia zmian lipidowych w aorcie (wyrażona jako procent powierzchni całej aorty) u myszy apoE-*knockout* kontrolnych i leczonych doksycykliną (n=15 w każdej grupie).

Ryc 16. Reprezentatywne mikrofotografie, ukazujące barwione czerwienią oleistą (*oil red-O*) zmiany miażdżycowe u myszy apoE-*knockout*, oraz zieloną fluorescencję, ukazującą aktywność MMPs metodą zymografii *in situ* - w grupie kontrolnej oraz grupie leczonej doksycykliną.

Ryc. 17. Wielkość zmian miażdżycowych w "korzeniu aorty", wyrażona w μ m², u barwionych ORO 6-miesięcznych myszy apoE-*knockout* kontrolnych i leczonych doksycykliną.

Ryc. 18. Wielkość aktywności MMPs, mierzona jako fluorescencja w "korzeniu aorty", wyrażona w μm^2 w zymografii *in situ*, u 6-miesięcznych myszy apoE-*knockout* kontrolnych i leczonych doksycykliną.

Ryc. 19. Skład blaszki miażdżycowej u 24-tygodniowych myszy, leczonych doksycykliną, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Immunohistochemiczne barwienie na marker makrofagów CD68 (na zielono).

Ryc. 20. Skład blaszki miażdżycowej u 24-tygodniowych myszy, leczonych doksycykliną, w porównaniu do grupy kontrolnej.

Immunohistochemiczne barwienie na α-aktynę mięśni gładkich (na pomarańczowo)

Ryc. 21. Poziom sVCAM-1 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 22. Poziom MCP-1 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 23. Poziom IL-6 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 24. Poziom IL-12 w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 25. Poziom SAA w osoczu w badanych grupach.

Ryc. 26. NO-zależne izometryczne rozkurcze pierścieni aortalnych myszy apoE – *knockout*, wstępnie przykurczanych $PGF_{2\alpha}$, jako reakcja na podanie wzrastających stężeń acetylocholiny