

Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz

MATRIX METALLOPROTEINASES AND ATHEROSCLEROSIS: REVIEW

Dr. Buket REEL^a

^aFarmakoloji AD, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İZMİR

Özet

Matriks metalloproteinaz (MMP)'ler ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenlerini yıkıma uğratan, Zn⁺⁺ ve Ca⁺⁺'a bağımlı bir nötral endopeptidaz ailesidir. MMP'lerin aktivitesi inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu, düz kas hücre migrasyonu ve proliferasyonu gibi aterosklerotik plak oluşumu ile ilişkili birçok süreç için temeldir. Ayrıca, MMP'ler, plak destabilizasyonu ve yırtılmasına yol açan olaylarla da ilişkilendirilmektedir. MMP'lerin aktivitesi fizyolojik koşullar altında onların endojen doku inhibitörleri "Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)" tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Ancak aterosklerotik plak gelişimi sırasında, sitokin ve büyüme faktörlerini stimüle eden gen transkripsiyonunun artması, zimojen aktivasyonunda artış ve MMP/TIMP oranındaki dengesizlik sonucu, MMP aktivitesi artmaktadır. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, sentetik MMP inhibitörlerinin ateroskleroz semptomlarının tedavisinde yararlı olabileceğini ortaya koymuştur. Bu derlemenin amacı MMP'lerin etkilerinin ve ateroskleroz patojenezine olan katkılarının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktır. Böylece, yaşamı tehdit eden aterosklerotik hastalıkların tedavisine ilişkin yeni yaklaşımların, farmakolojik ajanlar olarak yeni özgün MMP inhibitörlerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Matriks metalloproteinaz, ateroskleroz, ekstrasellüler matriks

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2006, 26:527-537

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of Zn⁺⁺- and Ca⁺⁺-dependent neutral endopeptidases that degrade components of extracellular matrix (ECM). The activity of MMPs is essential for many of the processes involved in atherosclerotic plaque formation, such as infiltration of inflammatory cells, smooth muscle cell migration and proliferation. Furthermore, MMPs have also been implicated in events leading to plaque destabilization and rupture. The activity of MMPs is tightly controlled by endogenous tissue inhibitors (Tissue inhibitors of metalloproteinases; TIMPs), under physiological conditions. However, during atherosclerotic plaque development, MMP activity is increased by rising cytokine- and growth factor-stimulating gene transcription, elevated zymogen activation and an imbalance in the MMP/TIMP ratio. It is therefore conceivable that inhibition of MMPs or re-establishing the MMP/TIMP balance may be useful in treating the symptoms of atherosclerosis. Recent studies demonstrated that synthetic MMP inhibitors were likely to be useful in treating the symptoms of atherosclerosis. The objective of this review was to assist the better understanding of the effects and contributions of MMPs on the pathogenesis of atherosclerosis. Understanding of the roles of MMPs in the pathogenesis of atherosclerosis may give rise to the proposition of new approaches for the treatment of life-threatening atherosclerotic disorders and to the development of new specific MMP inhibitors as pharmacological agents.

Key Words: Matrix metalloproteinase, atherosclerosis, extracellular matrix

ESM ve MMP'lerin Önemi

ESM, hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan dinamik, interaktif bir yapıdır.^{1,2} Dokulardaki hücrelerin bir arada tutulmasına yardımcı olur ve bunun yanı sıra hücre

büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon için rezervuar görevi yapar. Bu yapı hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirilmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleme yolları ile direkt ya da indirekt olarak etkileşmesini sağlar.² Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşmeler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik rol oynar.³

Vasküler ESM molekülleri damar duvarındaki intimal endotel hücreleri, medyal düz kas hücreleri ve adventisyal fibroblastlar tarafından sentez edilirler (Şekil 1).⁴ Yapılarında 3 temel protein bulu-

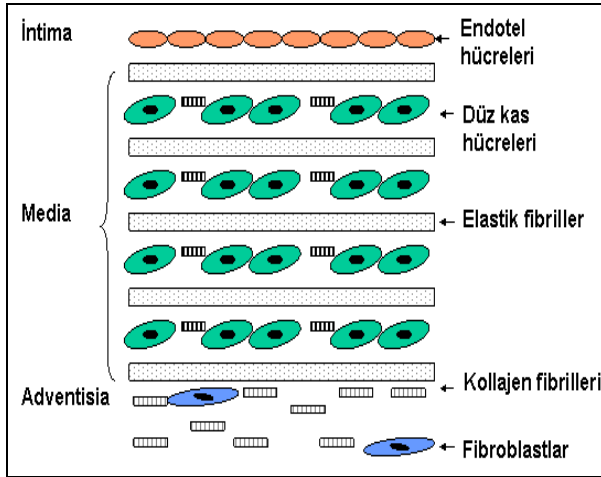
Geliş Tarihi/Received: 13.09.2005 Kabul Tarihi/Accepted: 25.01.2006

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Buket REEL
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji AD, Bornova, 35100, İZMİR
buket.reel@ege.edu.tr

Copyright © 2006 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2006, 26

527



Şekil 1. Damar duvarının yapısı (Jacob MP 2003'ten modifiye edilmiştir).

nur.² Bunlar proteoglikanlar, kollajen fibrilleri ve multiadhezif matriks glikoproteinleridir. Oldukça viskoz yapıda olan proteoglikanlar hücrelere yastık görevi yapar. Kollajen fibrilleri çözünür yapıda değildir; hücreye esneklik ve güç kazandırır.² Multiadhezif matriks glikoproteinleri ise çözünür yapıda olup proteoglikanlar ve kollajenin hücre yüzeyine bağlanmasını sağlar.²

ESM molekülleri hücrenin anahtar fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alırlar.¹ Şöyle ki; integrin moleküllerinin kardiyomyositler, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinin yüzeyinde bulunan integrin reseptörlerine bağlanmasını sağlayarak hücre fonksiyonları değiştiren sinyaller gönderirler. Böylece hücreler, sitozolik sinyal iletim yollarını direkt olarak aktive edebilirler.^{1,2} ESM'e bağlanma sonucunda sinyal oluşmazsa hücreler apoptozise uğrar. Bunun yanı sıra, matriks çok sayıda büyüme faktörünü bağlayarak hücrelerden gelen sinyalleri tutar ya da hücrelere gönderir. Bu şekilde indirekt sinyallemeye yollarını aktive ya da inhibe eder.^{1,2}

Matriks bileşenlerinden biri olan proteoglikanlar, lipoproteinleri bağlayarak arter duvarında düşük molekül ağırlıklı lipoprotein (LDL) partiküllerinin birikimine ve oksidatif mo-

difikasyonuna yol açarak aterosklerozun başlangıç fazlarına katılırlar.¹ Tüm bu özellikler ESM'in sadece çevresindeki hücrelere şekil veren bir yapı olmayıp yaşama, üreme ve ölüm gibi kritik hücre fonksiyonları etkileyen sinyaller gönderen dinamik, aktif bir ortam olduğunu göstermektedir.¹

Üstlendiği önemli görevler nedeniyle arteriyel ESM'in sentez ve yıkımında oluşan değişiklikler çeşitli vasküler hastalıklara yol açmaktadır.^{1,5} Hızlanmış arteriyel ESM yıkımı ateroskleroz gelişim sürecinin farklı aşamalarında etkili olur. Aterosklerotik plak oluşumunun başlangıç döneminde dışa doğru genişleme (kompensatuvar genişleme) meydana gelir. Bu da matriksin yeniden modellenmesine neden olur.^{4,5} Aterosklerozun ileri dönemlerinde oluşan trombotik komplikasyonlar sıklıkla fibröz başlığın (kepin) yırtılmasına ya da endotelin yüzeysel erozyonu sonucu aterosklerotik plağın parçalanmasına bağlıdır. Yeniden modellenmenin ileri safhasında gelişen anevrizma arteriyel patolojilerin en önemlilerinden biridir.^{1,5}

Hücre-matriks etkileşimleri ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler (ekstrasellüler proteazlar) tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar.^{3,6} Ekstrasellüler proteazların bu kadar çok fonksiyona sahip olmaları onları potansiyel terapötik hedefler haline getirmektedir.⁶

Bu enzim sistemlerinin içinde MMP'ler önemli bir grubu oluşturmaktadır. MMP'ler ESM bileşenlerini yıkıma uğratan Zn^{++} ve Ca^{++} 'a bağımlı nötral endopeptidaz ailesi olarak bilinirler. Türlerine göre endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, epitel hücreleri, mezanşimal hücreler, nötrofiller, trofoblastlar, osteoblastlar gibi oldukça çeşitli hücre tipi tarafından ekspres edilirler.^{7,8}

Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (TIMP'ler) arasında sürekli bir denge söz konusudur.⁹ MMP'ler ve TIMP'ler normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. Bunlar arasında kemiğin yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi, anjiyojenez, inflamasyon, apoptozis, immün cevap gelişimi, embriyonik gelişim, blastosit implantasyonu, organ morfogenez, sinir hücre gelişimi, ovülasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterin involüsyonu, endometriyal siklus ve saç folikülü siklusu sayılabilir.⁸

MMP ekspresyonu, gen transkripsiyonunu etkileyen faktörlerin etkisi altındaki çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda gelişen doku yeniden modellenmesi sırasında artar.¹⁰ Bu sırada MMP'lerin üretimi TIMP'lerin üretimini aşabilir. Böylece MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge bozulur.

Dengenin MMP aktivitesi yönüne kayması matriksin kontrolsüz olarak yıkılmasına ve sonuçta patofizyolojik olayların oluşumuna zemin hazırlar. MMP'lerin rol oynadığı patolojik olaylar arasında kanser ve ateroskleroz başta olmak üzere artrit, nefrit, gastrointestinal ülser, peridontal hastalık, kornea ülseri, deri ülseri, multipl skleroz, nörolojik hastalık, Alzheimer hastalığı, karaciğer fibrozu, fibrotik akciğer hastalığı, amfizem, kan beyin bariyerinin yıkılmasını sayabiliriz.⁸

Yeni üyelerin katılımı ile sürekli genişleyen bu enzim ailesinin bugüne dek klonlanmış ve sekanslanmış 66'dan fazla üyesi bulunmaktadır (Tablo 1).^{8,11-13} Bunlardan 23'ünün insanlarda sentez edildiği gösterilmiştir.¹⁴ Bu üyeler substrat özgüllüğüne göre kollajenazlar, jelatinazlar, stromelinler, membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ve diğerleri olmak üzere 5 alt grupta sınıflandırılmıştır.^{11,15} Diğerleri grubunda yer

Tablo 1. MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması.^{8,11-13}

Grup adı	Tanımlayıcı isim	Numara	Temel substrat
Kollajenazlar	İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen Tip 1, 2, 3, 7 ve 10, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz 3	MMP-13	Kollajen Tip 1, 2, 3
	Kollajenaz-4	MMP-18	Kollajen I
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, kollajen IV, V, VII; X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, kollajen IV, V, XIV, elastin, PG
Stromelinler	Stromelin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kollajen III, IV, IX, X
Membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)	MT1-MMP	MMP-14	Kollajen I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT3-MMP	MMP-16	Kollajen III, FN, jelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Jelatin
	MT5-MMP	MMP-24	PG
	MT6-MMP	MMP-25	Kollajen IV, fibrin, FN, jelatin
Diğerleri	Matrilisin 1	MMP-7	Serin proteaz inhibitörleri
	Metaloelastaz	MMP-12	Kollajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	RASI-1	MMP-19	Kollajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	Enamelisin	MMP-20	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	MMP-21	Tanımlanmamıştır
	CA-MMP	MMP-23	Tanımlanmamıştır
	Matrilisin 2	MMP-26	Kollajen IV, FN, jelatin, VN
	CMMP (Horoz)	MMP-27	Tanımlanmamıştır
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır

PG: Proteoglikan, FN: Fibronektin, VN: Vitronektin.

alan MMP-7 (matrilisin 1) ve MMP-26 (matrilisin 2)'nin 'matrilisinler' adı ile anıldığı 6. bir gruptan da söz edilen sınıflandırma da bazı kaynaklarda yapılmaktadır.¹⁴ En yaygın olarak kullanılan sınıflandırma şekli "substrat özgülüğüne göre" yapılan sınıflandırmadır. Bununla birlikte "molekül ağırlıklarına göre" veya "yapılarına göre" yapılan sınıflandırmalar da kullanılmaktadır.^{14,16,17}

MMP'lerin Yapısı

MMP'ler çeşitli ortak yapısal özelliklere sahiptirler. MMP'lerin tümü tipik olarak N terminalinde enzimin lider dizilimi olan pre-domain içerirler (Şekil 2).^{15,18} Bu lider dizilim enzimi salgılanma için etiketler ve salgılanma sonrası kaybolur. İkinci bölge olan pro-domain enzimin latent formda kalmasından sorumludur ve enzim aktivasyonunu takiben kaybolur. Bir sonraki kısım Zn^{++} bağlayan bölgeyi içeren katalitik domaindir.⁸ Katalitik domain ek olarak yapısal bir Zn^{++} iyonu ve 2-3 Ca^{++} iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir.⁸ MMP-7 ve MMP-26 dışındaki diğer bütün

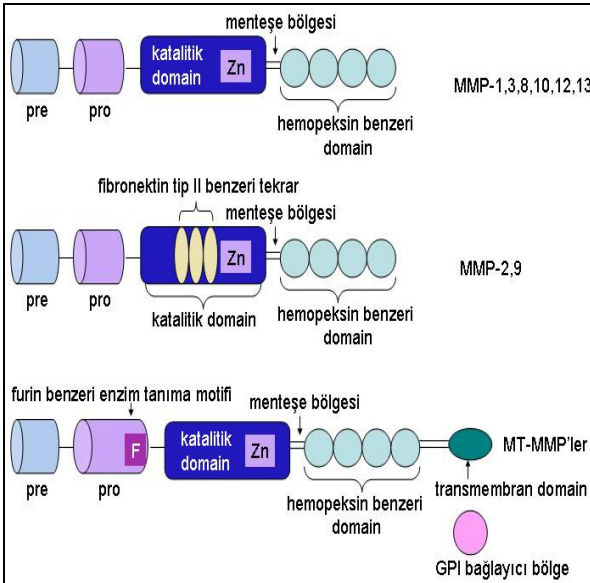
MMP'ler C terminalinde hemopeksin/vitronektin benzeri domain içerirler. Bu bölge aslında "hem" bağlayan bir peptittir. Ayrıca endojen doku inhibitörleri olan TIMP'lerin jelatinaz grubu MMP (MMP-2 ve MMP-9)'lere ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilidir.^{14,19}

Katalitik domaini hemopeksin benzeri domain bağlayan peptid pirolinden zengin olup, menteşe bölgesi adını alır.^{13,15,19} MMP-7 ve MMP-26'da hemopeksin benzeri domain ve menteşe bölgesi bulunmaz. Jelatinaz enzimleri katalitik bölümünde 3 adet fibronektin Tip 2 benzeri ilave bir domain bulundurlar. Bu kısım jelatinazların jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmalarını sağlar, böylece proteolitik aktivitelerini artırır ve elastolitik aktivite için de temeldir.²⁰ Bu yapısal özelliklere ek olarak MT-MMP'ler, MMP-11, MMP-23, MMP-28 pro-domain ile katalitik domain arasında yer alan ve enzimin hücre içi furin benzeri proteazlar tarafından tanınmasını sağlayan "furin benzeri enzim tanıma motifi" içerirler. MT-MMP'ler salgılanma öncesi bu motifi tanıyan proteazlar ile aktive edilirler.^{15,18} Ayrıca MT-MMP'lerden bazıları (MT1-,MT2-,MT3- ve MT5-MMP) C terminalinde transmembran domain içerirken bazıları da (MT4- ve MT6-MMP) glikozilfosfotidilinozitol (GPI) bağlayıcı bölge içerir.^{15,18}

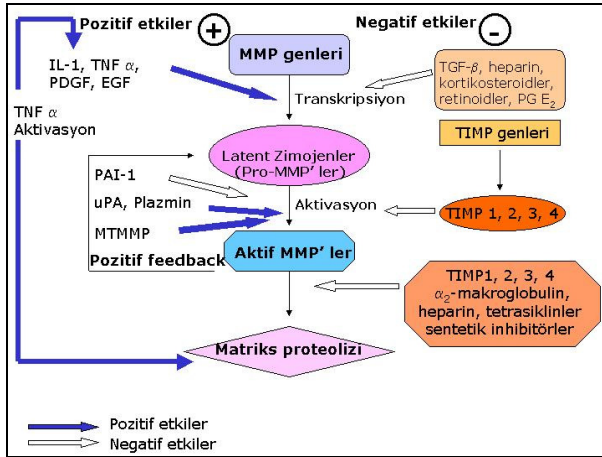
MMP Aktivitesinin Düzenlenmesi

MMP'ler vasküler ESM'in yıkımında esansiyel rol oynarlar. MMP'lerin tümü prepro-enzim olarak sentezlenir ve bunların çoğu inaktif latent zimojen form olan pro-enzim formunda salgılanır. Latent zimojenlerin aktivasyonu hücre içinde, MT-MMP'ler aracılığıyla hücre yüzeyinde, diğer proteazların etkisiyle ekstrasellüler aralıkta ya da "aktivasyon kaskadı" olarak adlandırılan şekilde ya da önceden aktive olmuş MMP'lerin diğerlerini aktive etmesiyle meydana gelebilir.¹²

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri 3 basamakta düzenlenir.¹⁶ Bunlar transkripsiyon, pro-enzimin aktivasyonu ve enzim aktivitesinin inhibisyonudur (Şekil 3).¹⁶



Şekil 2. MMP enzimlerinin moleküler yapısı (Vihinen P 2002 ve Kuzuya M 2003'ten modifiye edilmiştir).



Şekil 3. MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi (Dollery CM 1995'ten modifiye edilmiştir).

1) Transkripsiyonel Düzenleme

MMP gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile stimüle edilir (Şekil 3).^{16,19} Transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü- β (TGF- β), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E₂ (PGE₂) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler. MMP transkripsiyonunda etkili olan birçok sitokin ve büyüme faktörünün ateroskleroz ve restenozda önemli mediyatörler olarak görev yaptığı gösterilmiştir.^{16,19}

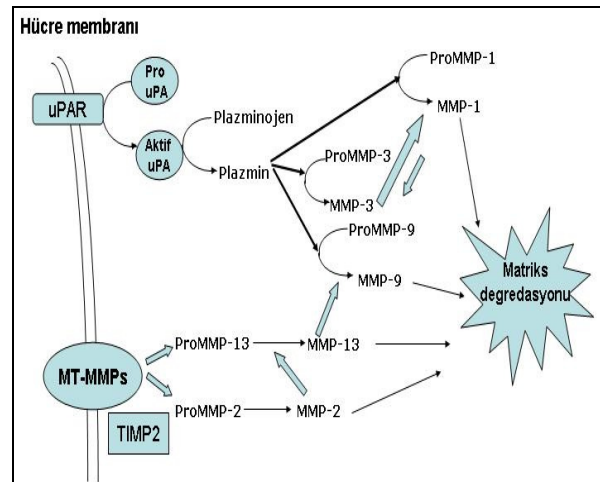
2) Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme

MMP'ler sentez edildikten sonra inaktif proenzim (zimojen) olarak salıverilirler. Enzimin pro- bölgesindeki sisteinin sülfidril grubu ile aktif bölgedeki Zn⁺⁺ arasındaki etkileşim latentliğin sürdürülmesinden sorumludur. MMP'lerin temel fizyolojik aktivatörü plazmindir. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi) eksprese edilen ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA)'nın aktif formunun plazminojeni plazmine dönüştürdüğü ve oluşan plazminin pro-MMP'leri aktive ettiği kabul edil-

mektedir (Şekil 3).^{10,16,21} uPA ekspresyonunun steroid hormonlar, hüresel onkojenler, sitokin ve büyüme faktörleri aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir.²² Çeşitli deneysel ateroskleroz modellerinde de arteriyel hasarı takiben gelişen düz kas hücre proliferasyonu sırasında damar duvarında uPA ekspresyonunun önemli oranda arttığı saptanmıştır.²³ Bu nedenle MMP aktivatörü olarak uPA'nın aterosklerotik plak oluşum sürecindeki doku yeniden modellenmesi dahil pek çok aterosklerotik aşamada rol oynadığı kabul edilmektedir.¹⁰ Diğer yandan uPA'nın in vitro olarak inhibisyonunun matris yıkımını anlamlı şekilde azalttığı ve benzer şekilde uPA geni bulunmayan farelerde damar hasarı sonrası neointima gelişiminin durduğu gösterilmiştir.^{24,25}

Plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), uPA üzerinde inhibitör etkilidir ve MMP'lerin plazmin aracılı aktivasyon kaskadı ile zıt yönde etkileşir.¹⁰ PAI-1 yetmezliğinin hasar sonrası neointima artışı stimüle ettiğinin gösterilmesi bu durumu desteklemektedir.²⁵

uPA aracılığı ile oluşan aktivasyon kaskadı ile pıhtılaşma kaskadı arasında benzerlikler vardır. uPA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP'nin aktivasyonu, diğer bir MMP'nin aktivasyonuna yol açar, aktiflenen enzim bir diğer MMP'yi aktive edecek şekilde pozitif bir döngü oluşturur (Şekil 4).¹⁰ Bu şekilde plazmin pro formdaki MMP-1,



Şekil 4. MMP'ler için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı (Beaudeux JL 2004'ten modifiye edilmiştir).

MMP-3 ve MMP-9'u aktif formuna dönüştürür. Daha sonra MMP-3 pro-MMP-1'i MMP-1'e dönüştürür, MMP-1 de pro-MMP-9'u aktif formuna dönüştürebilir. MT-MMP'ler de diğer MMP'lerin özellikle MMP-2'nin aktivatörüdürler. Oluşturdukları proteolitik aktivasyon plazminojen/plazmin aktivatör sistemine benzer şekilde hücre yüzeyinde gerçekleşir.^{10,16}

Diğer yandan MMP-2 ve MMP-9 (jelatinazlar) aktive olmuş doku makrofajları tarafından üretilen (özellikle aterosklerotik plak içindeki köpük hücre makrofajları) serbest radikal (SR)'lerin etkisiyle ESM içinde kendiliğinden aktive olabilir.¹⁰ Böylece oksidatif stres latent MMP zimojenlerinin aktivasyonunu tetikleyerek lokal metalloproteinaz aktivitesinin artmasına ve arteriyel duvarın yeniden modellenmesine katkıda bulunur.²⁶

3) MMP Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler anahtar rol oynarlar. Bundan başka α_2 -makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (Şekil 3).¹⁶

TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdir.⁸ Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lere irreversibl ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar.^{4,9} İnsanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 TIMP türü bulunmaktadır.^{8,9} TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler.^{7,16}

TIMP'ler MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden aralarında farklar vardır. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgülük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilirler.⁵

Aktif MMP inhibitörlerinden biri olan α_2 -makroglobulin yüksek molekül ağırlıklı bir serum proteindir ve aktif MMP-2'ye bağlandığında onun total molekül ağırlığını artırarak hareket yeteneğini kısıtlar, inhibitör etkinliğinin sıvı fazda gerçekleştiği ileri sürülmektedir.^{8,16}

Tetrasiklin analogları, non-selektif MMP inhibitörleri olarak kabul edilebilir (Tablo 2).^{10,11,18,27,28} MMP molekülünün Zn^{++} içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimde yapısal değişikliğe yol açarlar ve enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar.²⁹ Doksisisiklinin insan vasküler graft ateroskleroz modelinde intimal hiperplaziyi azalttığı ve sıçan aortik anevrizma modelinde anevrizma gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir.²⁹

Son yıllarda peptid ve non-peptid yapıda sentetik MMP inhibitörleri de üretilmiştir (Tablo 2).^{10,11,18,27,28} Bu inhibitörler en çok kanser tedavisinde olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriyazis, peridontal hastalık ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde

Tablo 2. Sentetik MMP inhibitörlerinin sınıflandırılması.^{10,11,18,27,28}

Sentetik inhibitör	Sınıfı	Selektivite
BB-94 (Batimastat)	Peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 7, 9
BB-2516 (Marimastat)	Peptido-mimetik	MMP-1, 2, 7, 9
AG3340 (Prinomastat)	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 3, 9, 13
Ro 32-3555 (Trocade)	Non-peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 9, 13
RS-130 830	Non-peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 7, 13
BAY 12-9566 (Tanomastat)	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 3, 9
BMS-275291 (Rebimastat)	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 9
CP-471 358	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 3, 8, 9, 12, 13, 14
CGS-27023A (MMI-270)	Non-peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 7, 9
AE-941 (Neovastat)	Köpek balığı kartilaj ekstresi	MMP-1, 2, 7, 9, 12,13
COL-3 (Metastat)	Sentetik tetrasiklin türevi	MMP-2, 9
Doksisisiklin (Periostat)	Sentetik tetrasiklin türevi	MMP-1

Tablo 3. Klinik denemeleri süren 2. kuşak sentetik MMP inhibitörleri.^{18,28,30}

Sentetik inhibitör	Tedavi alanı	Faz	Firma	Mekanizma
Periostat	Ateroskleroz, Periodontit	Başlangıç	Collagenex	MMP-1 inhibitörü
Neovostat	Kanser/Psöriazis	Faz III	Aeterna Laboratories	Kollajenaz, jelatinaz inhibitörü, VEGF reseptör-2 antagonisti
Dermostat	Akne	Faz II	Collagenex	Kollajenaz inhibitörü
CPA-926	Artrit	Faz II	Kureha Chemical Sankyo	MMP inhibitörü
DPC-333	Artrit	Faz II	Bristol Myers Squibb	MMP ve TNF konvertaz inhibitörü
S-3304	Kanser	Faz II	Shionogi	Jelatinaz ve MMP-14 inhibitörü
Rebimastat	Kanser	Faz II	Celtech Bristol Myers Squibb	Jelatinaz inhibitörü
CMT-3	Kanser	Faz II	Collagenex NIH	Kollajenaz inhibitörü
CP-471358	Kanser	Faz I	Pfizer	MMP-2 inhibitörü
ONO-4817	KKY ve artrit	Faz I	Ono	MMP-8 ve MMP-13 inhibitörü

KKY: Konjestif kalp yetmezliği.

denenmiştir.^{27,28,30} Bu ilaçların düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu azalttıkları, dolayısıyla ateroskleroz gelişimini inhibe ettikleri de deneysel çalışmalarda gösterilmiştir.³¹

Sentetik MMP inhibitörlerinden BB-94 (batimastat), BB-2516 (marimastat), Ro 32-3555 (Trocade), RS-130 830, BAY 12-9566, CGS-27023A (MMI-270)'nın etkinliklerinin yetersiz olması veya istenmeyen etkileri nedeniyle klinik denemelerine son verilmiştir.²⁸ İkinci kuşak MMP inhibitörleri olarak adlandırılan sentetik inhibitörlerin klinik denemeleri halen devam etmektedir. Bu inhibitörler Tablo 3'te verilmiştir.^{18,28,30}

Bunlardan başka kolesterol biyosentezinde anahtar enzim olan HMGCoA redüktaz enzimini inhibe ederek etki gösteren statinlerin (simvastatin, fluvastatin, serivastatin, pitavastatin ve pravastatinin gibi) de lipid düşürücü etkilerinden farklı olarak MMP sentez ve aktivitesini ve böylece aterosklerotik plak oluşumunu azalttıkları bildirilmiştir.³²⁻³⁴

Son yıllarda özellikle makrofajlar tarafından gerçekleştirilen MMP sentezine PGE₂'ye bağlı bir yolağın aracılık ettiği ve buna siklooksijenaz (COX) ve PGE sentaz (PGES) enzimlerinin katıldığı bildirilmiştir.^{12,35} COX enziminin COX-1 ve COX-2, PGES'nin ise cPGES ve mPGES olmak üzere 2'şer izoformları vardır. COX-1 ve cPGES yapısal olarak eksprese edilirken COX-2 ve mPGES enzimleri inflamatuvar hastalıklarda çeşitli uyarılara cevap olarak indüklenirler.³⁵ Son çalışmalarda COX-2 ve mPEGS enzim ekspresyonlarındaki artı-

şın aterosklerotik plaklardaki makrofajlarda artan aktif MMP düzeyleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.³⁵ Bazı statinlerin COX-2 ve mPEGS enzim supresyonu yaparak makrofaj kökenli MMP sentezini azalttığı bildirilmiştir.³⁵ Bu nedenle spesifik COX-2 inhibisyonunun MMP ekspresyonunu inhibe edebileceği ileri sürülmektedir.^{12,35}

Ateroskleroz ve kanser gibi MMP aktivitesinin arttığı patolojik durumlarda, endotelin reseptör antagonistlerinin ET ile uyarılan MMP ekspresyon ve aktivitesini de inhibe ettikleri gösterilmiştir.^{21,36}

Ateroskleroz Patojenezi ve MMP'lerin Rolü

MMP'lerin kardiyovasküler hastalıklarda esansiyel bir role sahip oldukları özellikle son birkaç yılda anlaşılmıştır. MMP enzimlerinin aterosklerotik sürecin erken dönemlerinde, arteriyel intimada hiperplazi gelişiminde ve aterosklerotik lezyonların plak yırtılmasına yol açacak şekilde zayıflamasında rolleri olduğu kabul edilmektedir.¹⁰

Aterosklerotik plak gelişimi dolaşımdaki monositlerin vasküler endotelyuma yapışması, subintimal aralığa geçmesi, bunu takiben hasar görmüş endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve dolaşımdaki inflamatuvar hücreler arasında bir seri kompleks hücre-hücre etkileşimlerinin meydana gelmesi sonucu bu hücrelerden çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve adhezyon moleküllerinin salıverilmesi ile paralel yürümektedir.^{16,29} Makro-

Tablo 4. Aterosklerozla ilişkilendirilen MMP'ler.^{7,10,12}

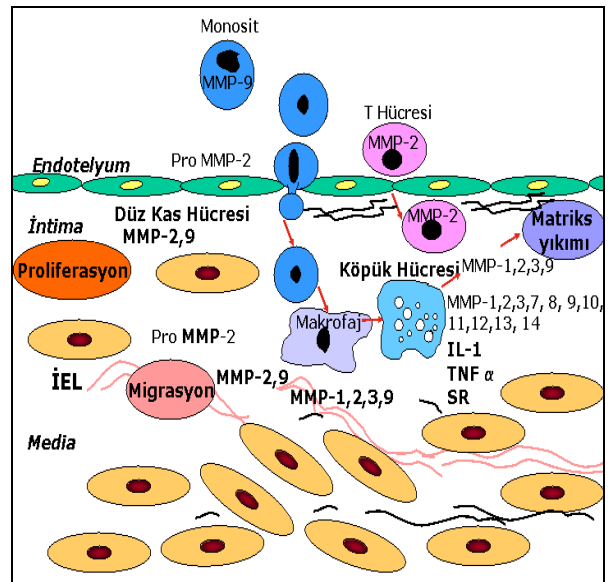
MMP türü	Referanslar	
	İnsan	Hayvan
Kollajenazlar		
MMP-1	Sukhova GK (1999), Galis ZS (1995 b)	Rekhter MD (2000)
MMP-8	Herman MP (2001)	
MMP-13	Sukhova GK (1999)	Carmeliet P (1997)
Jelatinazlar		
MMP-2	Galis ZS (1995 b)	Galis ZS (1995 a)
MMP-9	Galis ZS (1995 b)	Cho A (2000)
Stromelisinler		
MMP-3	Galis ZS (1995 b)	Galis ZS (1995 a)
MMP-10	Henney AM (1991)	
MMP-11	Schonbeck U (1999)	
MT-MMP'ler		
MMP-14	Rajavasthith TB (1999)	Jenkins GM (1998)
Diğerleri		
MMP-7	Halpert I (1996)	Rekhter MD (2000)
MMP-12	Halpert I (1996)	Carmeliet P (1997)

fajlardan salıverilen TNF- α ve IL-1, trombositlerden salıverilen PDGF, fibroblastlar ve endotel hücrelerinden salıverilen bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler, insanlarda vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, makrofajlar, lenfositler gibi farklı hücre tiplerinde değişen oranlarda olmak üzere MMP sentezini stimüle ederler.^{29,37,38}

Çeşitli deneysel ateroskleroz modellerinde oluşan aterosklerotik lezyonlarda ve aortik okluzif hastalığı ya da aortik anevrizması olan hastalardan alınan aterosklerotik arter örneklerinde özellikle MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13 ve MMP-14'ün ekspresyon ve aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Tablo 4).^{7,10,12}

Aktive olan MMP'ler kollajen, jelatin, elastin, laminin, proteoglikan gibi ESM proteinlerini yıkıma uğrattırır ve böylece düz kas hücre migrasyonunu kolaylaştırır, proliferasyonunu hızlandırır (Şekil 5).^{7,31,39} Süregelen düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sonrasında ESM birikimi aracılığıyla damar duvar matriksi modifiye edilir ve sonuçta erken dönemde intimal kalınlaşma ileri evrede de aterosklerotik plak

oluşumu gerçekleştirir.^{16,29,39} İntimal kalınlaşmanın önce yağ izlerine daha sonra da fibröz aterosklerotik plağa dönüşmesinde ESM döngüsü (yapım ve yıkımı) önemlidir, MMP'lerin de ESM döngüsünde temel rol oynadıkları kabul edilmektedir.³⁹ İntimal kalınlaşma gelişimi ve aterosklerozun erken dönem olayları genellikle jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) ile ilişkilendirilmiş ve neointima geliştirilen çeşitli deneysel hayvan modellerinde çoğunlukla jelatinazların ekspresyon ve aktiviteleri incelenmiştir.^{31,40} Bununla birlikte daha az da olsa diğer MMP'lerin de intimal kalınlaşma sürecine olan katkıları farklı çalışmalarda araştırılmıştır.^{25,41} Bu çalışmalar intimal kalınlaşma için MMP aktivitesinin temel olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca MMP'lerin fibröz doku matriksinin aşırı yıkımına bağlı aterosklerotik plağın zayıflayıp yırtılmasında da rol oynadığı bildirilmiştir.^{10,15} MMP'ler eksternal elastik laminanın parçalanmasına yol açarak arteriyel duvarın dışa doğru (pozitif) yeniden modellenmesini kolaylaştırır.^{7,12} Bu durum başlangıçta lümen genişliğini koruduğu için yararlı olmasına rağmen sonuçta arteriyel duvarın



Şekil 5. Ateroskleroz patojenezinde MMP aracılı matriks yıkımı sonrası hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri. (Galis ZS 2002'den modifiye edilmiştir). İEL: İnternal elastik lamina, SR: Serbest radikaller.

mekanik direncini azaltarak plağın yırtılma eğilimini arttırmaktadır.⁷ Aterosklerotik plağın yırtılmaya eğilimli bölgelerinde makrofaj kökenli köpük hücrelerinin biriktiğinin gösterilmesi, makrofaj kaynaklı MMP'lerin plak frajilitesi ve yırtılmasında önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir.¹⁵

Aterosklerotik plak dokusunda çeşitli MMP türlerinin (MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9) ekspresyon ve aktivasyonlarının arttığına gösterilmesi plak destabilizasyonunda MMP'lerin önemli role sahip olduğu görüşünü desteklemektedir.⁴² Benzer şekilde aortik anevrizmal lezyonlarda da MMP-3 ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir.⁴¹ Ayrıca MMP-1 ve MMP-13'ün ateromatöz plaklarda fibröz lezyonlara kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiştir.⁴³ Endarterektomi doku kültüründe MMP-7 ve MMP-12'nin fibröz plak içindeki lipid yüklü makrofajlarda arttığına gösterilmesi de plak yırtılmasında MMP'lerin önemli rolünü açıklamaktadır.⁴⁴ Yakın zamanlarda ise MMP-8'in aterosklerotik plaklarda aktivitesinin arttığı ve kollajeni parçalayarak plak destabilizasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir.⁴⁵ MMP-10'un aterosklerotik plak makrofajlarında artan ekspresyonunun plak stabilitesini azaltarak yırtılmaları kolaylaştırdığı ve yine insan aterosklerotik lezyonlarında MMP-11 aktivitesinin arttığı ve komplikasyonlara yol açtığı bildirilmiştir.^{46,47} Son olarak MMP-14'ün insan aterosklerotik plaklarında damarın media tabakasında MMP-2 ile birlikte bulunduğu ve MMP-2'yi aktive ederek aterosklerotik plakların yüzeysel erozyonuna yol açtığı gösterilmiştir.³⁸ Aterosklerotik sürece katkısı olduğu bilinen tüm MMP'lere ilişkin insan çalışmalarından elde edilen veriler, deneysel hayvan çalışmalarının verileri ile paralellik göstermektedir.^{25,37,48-50}

Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, MMP enzimlerinin ateroskleroz patojenezindeki esansiyel rollerini güçlü bir biçimde vurgulamaktadır. Bu nedenle MMP enzimlerinin ve aterosklerotik sürece olan katkılarının anlaşılması aterosklerotik hastalıklarda yeni tedavi yaklaşımla-

rının ve yeni özgün MMP inhibitörlerinin geliştirilmesine ışık tutabilecektir.

Teşekkür

Matriks metalloproteinazlar alanına yönelmem için bana büyük destek olan ve İngilizce özeti inceleyerek değerlendiren Doç.Dr. Zeliha Kerry'ye ve bu derlemenin gerçekleşmesinde her aşamada bilimsel katkılarını ve desteğini gördüğüm Prof.Dr. Gülgün Oktay'a teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation* 2000;102:1874-6.
2. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 1999. p.968-93.
3. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998;12:1075-95.
4. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003;57:195-202.
5. Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel, JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol* 2001;49:326-32.
6. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1119-27.
7. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-62.
8. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491-4.
9. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifaceted proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:187-98.
10. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:121-31.
11. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: Current developments and future perspectives. *Oncologist* 2001;6:415-27.
12. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003;59:812-23.
13. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
14. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
15. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:275-82.

16. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863-8.
17. Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705:69-89.
18. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002;99:157-66.
19. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60.
20. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann NY Acad Sci* 1994;732:31-41.
21. Rosano L, Salani D, Di Castro V, Spinella F, Natali PG, Bagnato A. Endothelin-1 promotes proteolytic activity of ovarian carcinoma. *Clin Sci* 2002;103(Suppl 48):306-9.
22. McCawley LJ, Li S, Benavidez M, Halbleib J, Wattenberg EV, Hudson LG. Elevation of intracellular cAMP inhibits growth factor-mediated matrix metalloproteinase-9 induction and keratinocyte migration. *Mol Pharmacol* 2000;58:145-51.
23. More RS, Underwood MJ, Brack MJ, de Bono DP, Gershlick AH. Changes in vessel wall plasminogen activator activity and smooth muscle cell proliferation and activation after arterial injury. *Cardiovasc Res* 1995;29:22-6.
24. Estreicher A, Wohlwend A, Belin D, Schleuning WD, Vassalli JD. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1989;264:1180-9.
25. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, et al. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 1997;17:439-44.
26. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993;91:2546-51.
27. Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: Design from structure. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt 1):17-20.
28. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev* 2004;9:63-79.
29. Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med* 2002;7:117-33.
30. Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke* 2002;33:2858-64.
31. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:28-33.
32. McFarlane SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Clinical review 145: Pleiotropic effects of statins: Lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1451-8.
33. Porter KE, Turner NA. Statins for the prevention of vein graft stenosis: A role for inhibition of matrix metalloproteinase-9. *Biochem Soc Trans* 2002;30:120-6.
34. Suzuki H, Kobayashi H, Sato F, Yonemitsu Y, Nakashima Y, Sueishi K. Plaque-stabilizing effect of pitavastatin in Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:109-16.
35. Cipollone F, Fazio M, Iezzi A, et al. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation* 2003;107:1479-85.
36. Rosano L, Spinella F, Salani D, et al. Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003;63:2447-53.
37. Cho A, Graves J, Reidy MA. Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2527-32.
38. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999;274:11924-9.
39. Zaltsman AB, Newby AC. Increased secretion of gelatinases A and B from the aortas of cholesterol fed rabbits: Relationship to lesion severity. *Atherosclerosis* 1997;130:61-70.
40. Godin D, Ivan E, Johnson C, Magid R, Galis ZS. Remodeling of carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model. *Circulation* 2000;102:2861-6.
41. Carrell TW, Burnand KG, Wells GM, Clements JM, Smith A. Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are overexpressed in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2002;105:477-82.
42. 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;94:2493-503.
43. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999;99:2503-9.
44. Halpert I, Sires UI, Roby JD, et al. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9748-53.
45. Herman MP, Sukhova GK, Libby P, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: A novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104:1899-904.

46. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, et al. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:8154-8.
47. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, et al. Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: Regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1999;189:843-53.
48. Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhofer R, Clark S, Libby P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:402-6.
49. Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, et al. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 1998;97:82-90.
50. Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, et al. Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma: Local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture. *Circ Res* 2000;86:101-8.