

# Mátrix-metalloproteináz-2-gátlás kardioprotektív szerepe a miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodásban: preklinikai és klinikai adatok

Kiss Krisztina<sup>1</sup>, Bencsik Péter<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Gyermekgyógyászati Klinika, Tűzoltó utcai Részleg, Budapest

<sup>2</sup>Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Szeged

<sup>3</sup>Pharmahungary Csoport, Szeged



A társszerző  
video-összefoglalója

Levelezési cím:

Dr. Bencsik Péter PhD, 6720 Szeged, Dóm tér 12. E-mail: [bencsik.peter@med.u-szeged.hu](mailto:bencsik.peter@med.u-szeged.hu)

Az iszkémiás szívbetegségek, beleértve a heveny szívizomelhalást, jelenleg vezetnek a magyarországi halálozási statisztikákat. Az elmúlt közel négy évtizedben intenzív kutatás folyt iszkémiaellenes kardioprotektív folyamatok és célmolekulák felderítésére és gyógyszeres befolyásolására. Ennek ellenére továbbra sem áll rendelkezésre az infarktus mértékét csökkentő törzskönyvezett gyógyszer. Ezért rendkívül fontosnak tartjuk az új potenciális gyógyszer-célpontok keresését és az ezirányú gyógyszerfejlesztést. A mátrix-metalloproteinázok (MMP), különösen az MMP-2 szerepe a miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodásban több mint 2 évtizede ismert és intenzíven kutatott terület. Kutatócsoportunk a 2000-es évek elején kapcsolódott be ebbe a témába gyógyszerfejlesztési szándékkal. Korábban erős, magyar kémiai fejlesztői háttér segítségével több ígéretes gyógyszer-molekula-jelöltet sikerült előállítanunk, amelyek reprodukálható módon kardioprotektívnak bizonyultak több preklinikai modellben, azonban a kémikusi háttér vizsgálatokból való későbbi kiesése miatt a további kutatások megtorpantak. Jelen tanulmány célja, hogy átfogó betekintést nyújtson részben a kardioprotektív irányú MMP-2-gátlás alapkutatói háttéréről, az általunk végzett gyógyszerfejlesztési kísérletek, valamint a nemzetközi irodalomban fellelhető klinikai vizsgálatok eredményeiről.

**Kulcsszavak:** akut miokardiális infarktus, mátrix-metalloproteináz-2, kardioprotekció, MMP-inhibitor, gyógyszerfejlesztés

## The cardioprotective role of matrix metalloproteinase-2 inhibition in myocardial ischemia/reperfusion injury: preclinical and clinical data

Ischemic heart disease, including acute myocardial infarction, currently leads the mortality statistics in Hungary. Over the past nearly four decades, intensive research has been conducted to identify and pharmacologically target cardioprotective processes and molecules against myocardial ischemia/reperfusion injury. Despite this huge effort, there is still no registered drug available that reduces the rate of myocardial infarction. Therefore, the search for new potential drug targets and drug development in this direction is of utmost importance. The role of matrix metalloproteinases (MMPs), particularly MMP-2, in myocardial ischemia/reperfusion injury has been known and intensively studied for more than two decades. Our research group became involved in this field in the early 2000s with the intention of drug development. With the help of a strong Hungarian chemistry background, we have developed several promising drug candidates that have shown reproducible cardioprotection in several preclinical models, but currently, due to the lack of professional chemical support, further experiments have been suspended. The aim of this manuscript is to provide a comprehensive insight, in part, into the basic research background of MMP-2 inhibition toward ischemic cardioprotection, the results of our drug development trials, as well as into the clinical trials available in the international literature.

**Keywords:** acute myocardial infarction, matrix metalloproteinase-2, cardioprotection, MMP inhibition, drug development

## Bevezetés

Hasonlóan a nyugati országokhoz az iszkémiás szívbetegségek (ISZB) immáron több, mint harminc éve a vezető halálokok közé tartoznak hazánkban (1, 2). Habár a heveny szívizomelhalás okozta halálozás a kilencvenes évek óta jelentősen csökkent, a kardiovaszkuláris betegségek okozta mortalitás aránya mit sem változott (1). Ezen adatok alátámasztják annak fontosságát, hogy napjainkban is intenzív kardiológiai kutatások történjenek mind az iszkémiás szívbetegségek patofiziológiájának pontosabb megértésére, mind a diagnosztikus markerek, terápiás lehetőségek bővítésére.

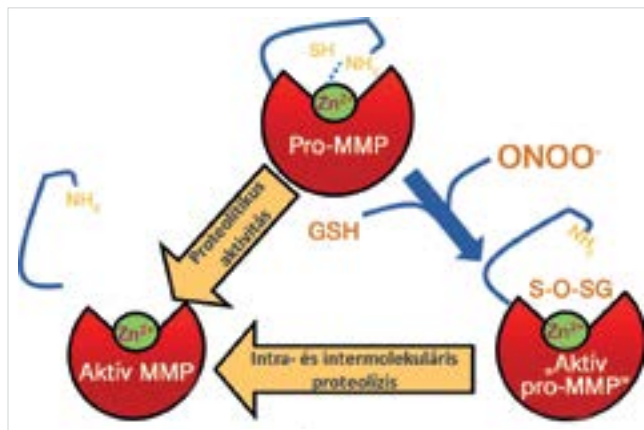
## Az ISZB és a mátrix-metalloproteinázok

Az iszkémiás szívbetegségek legfőbb rizikófaktorára, az ateroszklerózisra jelenleg, mint krónikus gyulladásos folyamatra tekintünk, amelynek során a felszabaduló proinflammatorikus citokinek mellett egyéb enzimek, többek között a mátrix-metalloproteinázok (MMP) is aktiválódnak (3). Az MMP-k patológiai szerepét a kardiovaszkuláris betegségekben elsőként éppen az ateroszklerotikus plakk növekedésében és ruptúrájában, valamint az akut miokardiális infarktust (AMI) követő remodellációs folyamatokban igazolták (3–5).

## A mátrix-metalloproteináz-2 biokémiája, aktiválódása

A mátrix-metalloproteinázok cinktartalmú endopeptidázok, amelyek kollagénbontó tulajdonságát elsőként 1962-ben, az ebihalak farkának felszívódása során fedték fel (6). 1975-ben mutatták ki az első kollagenolitikus fehérjét humánszövetből (7), majd egy évtizeddel később azonosították a humán fibroblaszt kollagénáz szekvenciáját, amelyet MMP-1-nek neveztek el (8). A későbbiekben több fehérjét is találtak, amelyek az MMP-1 katalitikus doménjével mutattak szekvencia-homológiát; ezek a fehérjék alkotják jelenleg az MMP-k megközelítőleg 30 tagú családját (9, 10). Ezek az enzimek számos fiziológiai folyamatban vesznek részt, ilyen például az embriogenezis, vagy az angiogenezis; emellett olyan kóros folyamatokban is szerepük van, mint a malignus tumorok áttétképződése, vagy az ízületi-, illetve egyéb gyulladásos folyamatok (11).

Az MMP-k közül az MMP-2 az, amely a szív különböző típusú sejtjeiben megtalálható, beleértve a cardiomyocytákat is (12, 13). Eredetileg ezt a kettes típusú MMP-t nevezték zselatináz-A-nak, a fő extracelluláris szubsztrátja után, és gyakran a mai napig így hivatkoznak rá (14). „Testvér” enzime az MMP-9-zselatináz B-, amely főként az aktivált leukocitákhoz, makrofágokhoz kötődik, ezáltal szerepet játszva a gyulladásos folyamatokban, többek között a fent említett ateroszklerotikus



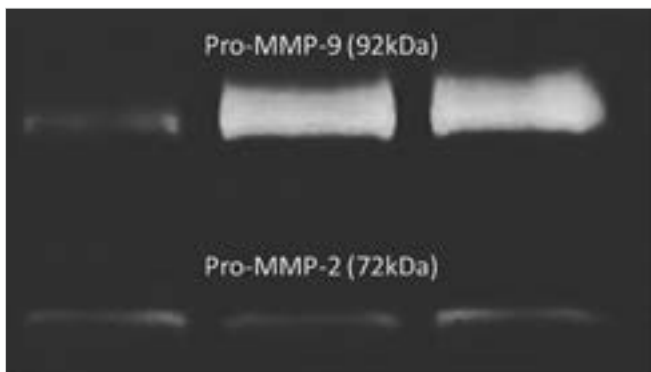
**1. ÁBRA.** Az MMP-k aktiválódásának lehetséges útvonalai. Az inaktív formában szintetizálódó pro-MMP-ből az inhibitor propeptid domén lehasadhat proteolízis útján (bal oldali nyíl), ez kisebb molekulatömegű aktív MMP-t eredményez. Az aktiválódás másik lehetséges módja (jobb oldali nyíl) a nitro-oxidatív stressz során képződő peroxinitrit (ONOO-) és az egyidejűleg jelenlévő celluláris glutation (GSH) által végbemenő S-glutatioiláció az aktív centrum cinkionját blokkoló ciszteinmolekulán; ennek során az inaktív pro-MMP-vel megegyező molekulásúlyú aktív pro-MMP képződik. Az aktív pro-MMP-ről további proteolízissel ugyancsak a kisebb molekulásúlyú aktív MMP is képződhet (módosított ábra [11] referencia alapján)

plakk patofiziológiájában is (15). Ez a fajta elnevezés azonban abból a szempontból is megtévesztő, hogy azóta az MMP-2-nek is nemcsak számos extracelluláris, hanem több intracelluláris szubsztrátját is azonosították (részletesen lásd alább) (14).

Az MMP-2, a többi MMP-hez hasonlóan, inaktív zimogén formában szintetizálódik, ahol az aktív centrumban egy cinkion és a propeptid domén cisztein molekulája közötti hidrogénkötés blokkolja a katalitikus aktivitást (15). Ennek a kötésnek a felszakadása, illetve a propeptid domén lehasítása szükséges az enzim aktiválásához, amely történhet többek között reaktív oxigén-nitrogén gyökök, például a szívizom iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása során felszabaduló peroxinitrit molekula által (9), vagy egyéb enzimek, például az MMP-14 indukálta proteolízissel (1. ábra) (14, 16). Az aktivációban ezen kívül számos egyéb folyamat játszhat szerepet: foszforiláció, S-glutatioiláció, allosztérikus aktiváció (urea, SDS) stb. További aktivátorok lehetnek a hőshock-fehérjék, a proteinkináz-A és -C, vagy a glikogén-szintáz-kináz is, amelynek az AMI-ban, valamint a leginkább elfogadott endogén kardioprotektív adaptációs mechanizmusban, az iszkémiás prekondicionálás folyamatában van kiemelkedő szerepe (15).

## A MMP-2 gyakoribb kimutatási lehetőségei

Az MMP-2 és MMP-9 mennyisége mérhető Western blot vagy ELISA-módszerrel (16, 17). Ezen módszerek



**2. ÁBRA.** Reprezentatív zimogram gélelektroforézist követően. Az eltérő molekulatömegű aktív pro-MMP-9 és pro-MMP-2 az elektroforézis során egymástól jól elkülönül. Az értékelés során az egyes sávok területének és denzitásának szorzata adja meg az MMP-k aktivitását

legfőbb hátránya, hogy az enzimek működéséről nem adnak információt, ami sok esetben nem áll arányban az enzimek mennyiségével. A meghatározás során az MMP-k redukáló közegbe kerülnek, amelynek hatására a natív konformációjuk megbomlik és elvesztik működőképességüket. A Western blot további nehézsége, hogy az eltérő molekulatömegű izoenzimek detektálásához különböző antitestek szükségesek.

A MMP-k működéséről pontosabb adatokat kaphatunk aktivitásuk meghatározásával, amely zimográfiával (enzimzimográfiával) lehetséges. Ennek lényege, hogy a molekulatömegük alapján elválasztott enzimeket (MMP-2, MMP-9) zselatintartalmú géltre visszük fel, ami az enzimek fiziológias szubsztrátja. Az enzimek a szubsztrátot a molekulatömegüknek megfelelően egy-egy meghatározott sávban bontják. A gél Coomassie kékkel történő megfestése után a zselatin emésztése láthatóvá válik (ahol az enzim működik, ott a gél nem festődik), ennek denzitása szemkvantitativ módon meghatározható (2. ábra) (16, 18).

### Az MMP-2 szubsztrátjai és szerepe a szív iszkémia/reperfúziós károsodásában

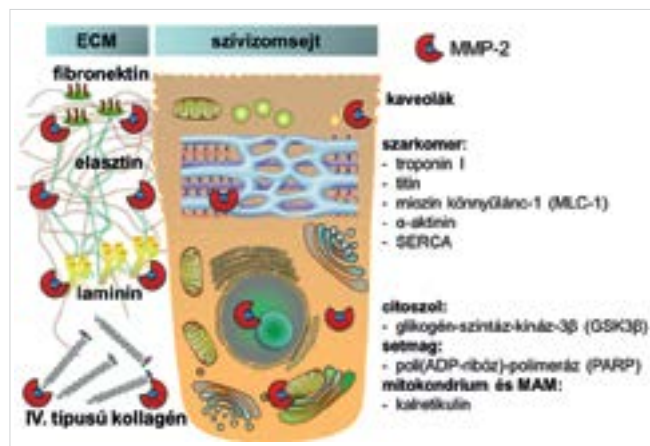
Az szívizom iszkémia/reperfúziós károsodása során az aktiválódó MMP-2 jelentős szerepet játszik úgy az akut, reverzibilis kontraktilis diszfunkció kialakulásában, mint a remodelláció folyamatában (19). Az I/R károsodás során másodperceken-perceken belül felszabaduló reaktív oxigén-nitrogén szabadgyökök hasonló időablakon belül aktiválják az MMP-2-t, ami olyan kontraktilis fehérjéket képes bontani, mint a troponin-I, a titin, a miozin könnyűlánc-1 vagy az alfa-aktinin (13, 20, 21). Az MMP-2 a szívizomsejteken belül további intracelluláris sejtalkotókkal is kapcsolatban áll, ilyenek többek között a szarkomerek, a citoszkeleton, a nukleusz, a mitokondriumok, a mitokondrium-asszociált membrán vagy a kaveolák (lásd még (3. ábra) (11–13, 20). Ezen organelumokon belüli konkrét szubsztrátok, illetve

azok pontos szerepe az iszkémiás szívbetegségekben jelenleg még nem tisztázott.

Miokardiális infarktushoz vezető súlyos iszkémia esetén az extracelluláris mátrix fehérjéi is – úgy mint a kollagén, a laminin, az elasztin, vagy a fibronectin – károsodhatnak az MMP-2 indukálta proteolízis során (3. ábra) (22–24), hozzájárulva ezzel az infarktus késői következményeként kialakuló szívelégtelenséghez (11). Egy korábbi tanulmányban MMP-2 génkiütött egerekben csökkent a mortalitás miokardiális infarktust követően, illetve az MMP-2 hiánya pozitív hatással volt a remodelláció folyamatára is; megelőzte például az extracelluláris mátrix egyes komponenseinek degradációját (25, 26). Transzgén egerekben a konstitutívan aktív MMP-2 csökkent bal kamrai ejekciós frakciót eredményezett, valamint egyéb szövettani elváltozásokat úgy, mint szívizomsejt-hipertrofiát, miofilamentum-lízist (27). Ezek az egerek érzékenyebbek voltak a szívizom-iszkémia/reperfúziós károsodására, bennük nagyobb volt az elhalt szívizomterület mérete, illetve a kontraktilis funkció romlása is (28).

### Az MMP-2 mint biomarker iszkémiás szívbetegségben

Ismerve az MMP-2 kardiális hatásait, adódik a kérdés, hogy vajon az iszkémia-reperfúzió során aktiválódó MMP-2 használható lenne-e új biomarkerként iszkémiás szívbetegségben. Kutatócsoportunk stabil angina pectorisban szenvedő egy-ér koronáriabetegekben igazolta, hogy a peroxinitrit markereként vizsgált 3-nitrotozin mennyisége negatívan korrelál a bal kamrai ejekciós frakcióval, szignifikáns korrelációt mutat a lipidpanel egyes komponenseivel, míg az MMP-2 aktivitása pozitívan korrelál az össz- és az LDL-koleszterin-szinttel (29). További kísérletek igazolják, hogy a



**3. ÁBRA.** Az MMP-2 lokalizációja és szubsztrátjai a miokardiális intra- és extracelluláris térben. SERCA: szarko-endoplazmatikus  $Ca^{2+}$ -ATPáz; MAM: mitokondrium asszociált membrán (módosított ábra Hughes és munkatársai 2014 [14] alapján)

véralplazma MMP-2 és MMP-9 aktivitása megemelkedik a koronáriabetegek vérében (30), ST-elevációs miokardiális infarktusban szenvedő betegekben az MMP-2 mennyisége korrelál a infarktus méretével, a bal kamrai diszfunkcióval, és a szérumban troponin-I szinttel (3). Ismert továbbá, hogy az MMP-2 a humán myocardiumban az iszkiémiát követően 10 percen belül aktiválódik és az aktivitás maximuma egybeesik a kontraktilis funkció „mélypontjával”, 3 órával a reperfúziót követően (31). Ezek alapján az MMP-2 mennyiségének és aktivitásának mérése segítség lehet akár a miokardiális károsodás mértékének meghatározásában, akár a terápia tervezésében.

### Az MMP-2 gátlásának lehetőségei

Az MMP-k aktivitásának „egyensúlyban tartásáért” az aktivátorok mellett endogén inhibitorok felelősek, ezek a TIMP-ek (tissue inhibitors of metalloproteinases), amelyeknek jelenleg négy izoenzime ismert emlősökben (28). Ezek közül a TIMP-4, amely a cardiomyociták vékony filamentumában is kimutatható, peroxinitrit hatására inaktiválódik (32) és az iszkémia/reperfúziós károsodás során az aktiválódott MMP-2-t nem tudja hatékonyan gátolni (15, 33).

Tekintettel arra, hogy az aktiválódott MMP-k számos, különböző patológiás folyamatban vesznek részt, farmakológiai gátlásuk ígéretes terápiás célpont már a kilencvenes évek óta (14). A 2000-es években számos MMP-gátlót azonosítottak, köztük hidroxamátok, tiolok, karbamoil-foszfónátok, hidroxikarbamidok, hidrazinok,  $\beta$ -laktámok, szquarinsavak és nitrogéntartalmú ligandumok (34). Ezek közül a legtöbb egy fémkoordináló funkciós csoporton, az úgynevezett cinkkötő csoporton (ZBG) keresztül fejt ki hatását, amely az MMP-k katalitikus cink ionjához kötődik. A legkorábbi inhibitorok a hidroxamát típusú vegyületek voltak (legismertebb közülük az ilomastat), amik az aktív centrum cink ionjához kötődtek, gátolva ezzel az MMP-k összes izoenzimjét, illetve a többi cinktartalmú metalloproteinázt is (14). Habár ezek a molekulák a preklinikai kísérletekben hatékonyak voltak, a klinikai vizsgálatok során súlyos mellékhatások jelentkeztek (muszkuloszkeletális-szindróma néven összefoglalt ízületi fájdalom, merevség, csökkent mobilitás), amik miatt az effektív dózis nem volt alkalmazható (35). A mellékhatások elkerülésére ma már több, úgynevezett „harmadik generációs” MMP-inhibitor létezik, amiknek első sorban az MMP-1-re gyakorolt gátló hatásuk redukálódott. Jelenleg a legvalószínűbb feltételezés szerint az MMP-1-gátlás lehet felelős a muszkuloszkeletális-szindrómáért (36).

Egyetlen, nem szelektív, hidroxámsav típusú MMP-gátlóval (PG-116800), relatív nagyszámú STEMI-beteg bevonásával végzett, korai klinikai vizsgálatról van elérhető közlemény, amely a PREMIER-study néven futott (37) és 2006-ban neutrális eredménnyel zárult (ld.

később). Jelenleg az egyetlen, klinikumban is használt MMP-inhibitor (MMPI) a széles spektrumú, fehérjeszintézis-gátló antibiotikumként ismert doxiciklin, amelyet gyógyszer-repozícionálást (indikációbővítés) követően periodontitis és rosacea indikációban alkalmaznak (38, 39). A tetraciklinek mint cink-kelátorok gátolják az MMP-eket és ezt a hatásukat már szub-antimikrobiális dózisban is képesek kifejteni, ezáltal kevesebb mellékhatást okoznak (40).

### MMP-2-gátlás szerepe az ISZB-ben, preklinikai és klinikai studyk

A különböző széles spektrumú, illetve szelektívebb MMPI-okkal számos preklinikai kísérlet történt az elmúlt két évtizedben [részletesen bemutatva Hughes és Schulz (14) összefoglaló közleményében]. Ezek eredményei alapján összességében megállapítható, hogy az MMPI-kkel való kezelésnek védő hatása van a miokardiális infarktust követő bal kamrai remodellációra. Továbbá, az MMPI-k csökkentik az infarktus méretét *in vivo* iszkémia-reperfúziós modellekben és javítják az *ex vivo* I/R kísérletekben indukált miokardiális „stunning” jelenséget (14).

Egy fentebb már említett, korai vizsgálatban a PG-116800 kódjelű nem-szelektív, hidroxámsav típusú MMP-gátlóval 128 kontroll és 125 MMP-gátlóval kezelt beteg bevonásával végzett, korai klinikai vizsgálatban (PREMIER-study) az MMPI-nek nem volt hatása a bal kamrai remodellációra és a súlyos nemkívánatos kardiológiai eseményekre (major adverse cardiac events; MACE) (37).

Számos preklinikai tanulmányt követően, amelyekben a doxiciklint alkalmazva több kutatócsoport által is sikerült kardioprotektív hatást elérni miokardiális infarktust követően akután és hosszabb távon vizsgálva is a késői szövődményeket, ezidáig összesen négy klinikai kísérlet folyt a témában (1. táblázat).

A MIDAS (MMP Inhibition with sub-antimicrobial doses of Doxycyclin to prevent Acute coronary Syndromes) kísérletben 6 hónapon keresztül, napi 2x20 mg dózisban adott doxiciklin csökkentette a plazma MMP-9 aktivitását és a C-reaktív protein mennyiségét, viszont nem volt hatással a klinikai végpontokra (például a hirtelen halál valószínűsége, vagy a miokardiális infarktus előfordulása) (41).

2013-ban randomizált, kettős vak, placebokontrollált vizsgálatban tesztelték a doxiciklin hatását elektív kardiopulmonalis bypass graft (CPB) műtétre kerülő pácienseknél. A doxiciklint szub-antimikrobiális dózisban alkalmazták (20 mg naponta kétszer) legalább két nappal a műtét előtt kezdve, a műtét napján és az első három posztoperatív napon. A doxiciklint kapó betegeknek a jobb pitvari biopsziában mért MMP-2 aktivitása alacsonyabb volt a placebokontrollhoz képest, ugyanakkor a doxiciklin nem volt hatással a kamrai stroke work indexre a reperfúziót követően. Mivel a vizsgálatban a

1. TÁBLÁZAT. Az MMP-2-gátlókkal végzett klinikai vizsgálatok

Study név	Kontroll (fő)	Kezelt (fő)	Kezelés	Vizsgálati időtartam	Eredmény/kimenetel	Ref. száma
PERMIER	128	125	PG-116800 2×200 mg 90 napon át	90 nap	Az MMP-gátló kezelésnek nem volt hatása a bal kamrai remodelációra és a klinikai végpontokra	37
MIDAS	24	26	doxiciklin 2×20 mg 6 hónapon át	6 hónap	A doxiciklin csökkentette az MMP-9 aktivitását és a C-reaktív protein mennyiségét. A klinikai végpontokban nem volt különbség	41
Doxiciklin CPB-re kerülő betegekben	22	20	doxiciklin 2×20 mg a műtét előtti napokon és 3 posztoperatív napon át	24 óra	A doxiciklin csökkentette az MMP-2 aktivitását; nem volt hatással a kamrai stroke work indexre	42
TIPTOP	55	55	doxiciklin a PCI után majd 2×100 mg 7 napon át	6 hónap	A kezelt csoportban alacsonyabb volt az infarktus mérete, súlyossága, és a bal kamrai végdiasztolés térfogatindex	43
SALVAGE-MI	53	50	doxiciklin a PCI előtt majd 2×100 mg 7 napon át	6 hónap	A doxiciklin nem csökkentette az infarktus méretét és nem volt hatással a bal kamrai remodelációra sem	44
NCT03508232	bevonás alatt	bevonás alatt	doxiciklin telítődózis 200 mg, majd 100 mg 12 óránként 7 napon át	3 hónap – 1 év	folyamatban lévő klinikai vizsgálat, várható eredmény: 2023 decemberében	–

troponin-I szintjében nem volt különbség a két csoport között, a kísérlet egyik fő limitációja, hogy a szívizomkárosodás olyan minimális volt, hogy a doxiciklin ezért sem mutatott protektív hatást (42).

2014-ben TIPTOP-trial néven, *Cerisano és munkatársai* klinikai körülmények között is tesztelték a doxiciklin kardioprotektív hatását 110 akut, első STEMI-n átesett beteget bevonva a vizsgálatba (fele-fele arányban a placebo és a doxiciklinnel kezelt csoportba sorolva) (43). A betegeket 100 mg doxiciklinnel kezelték közvetlenül a primer koronáriaintervenciót (PCI) követően, valamint az azt követő 7 napon, naponta kétszer. Vizsgálatuk pozitív eredménnyel zárult: a doxiciklinkezelésben részesült betegek csoportjában alacsonyabb volt az infarktus mérete és súlyossága, mint a kontrollcsoport betegei között, valamint a bal kamrai végdiasztolés térfogatindex értékei is alacsonyabbak voltak 6 hónappal az infarktust és a kezelést követően a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Amint a szerzők a következtetések között is rámutattak, eredményeik megerősítéséhez nagyobb számú beteg bevonásával történő, multicentrikus vizsgálatokra van szükség.

A doxiciklinnel való legutóbbi klinikai vizsgálat eredménye 2023 áprilisában jelent meg. A SALVAGE-MI (upStreAm doxycycline in ST-eLeVation myocArdial infarction: targetinG infarct hEaling and Modulaton) kísérletben a TIPTOP-trial-hoz hasonlóan, PCI-re kerülő STEMI-ben szenvedő betegek egy csoportja részesült doxiciklinkezelésben: 100 mg bólus doxiciklin közvetlenül a PCI előtt, majd naponta 2×100 mg további 7 napon keresztül. A vizsgálat eredménye alapján a doxiciklin nem csökkentette az infarktus méretét sem akután, sem hat hónappal a beavatkozás után a placebo-kontrollcsoportéhoz képest. Nem volt továbbá pozitív hatás a bal kamrai remodelációra sem (44).

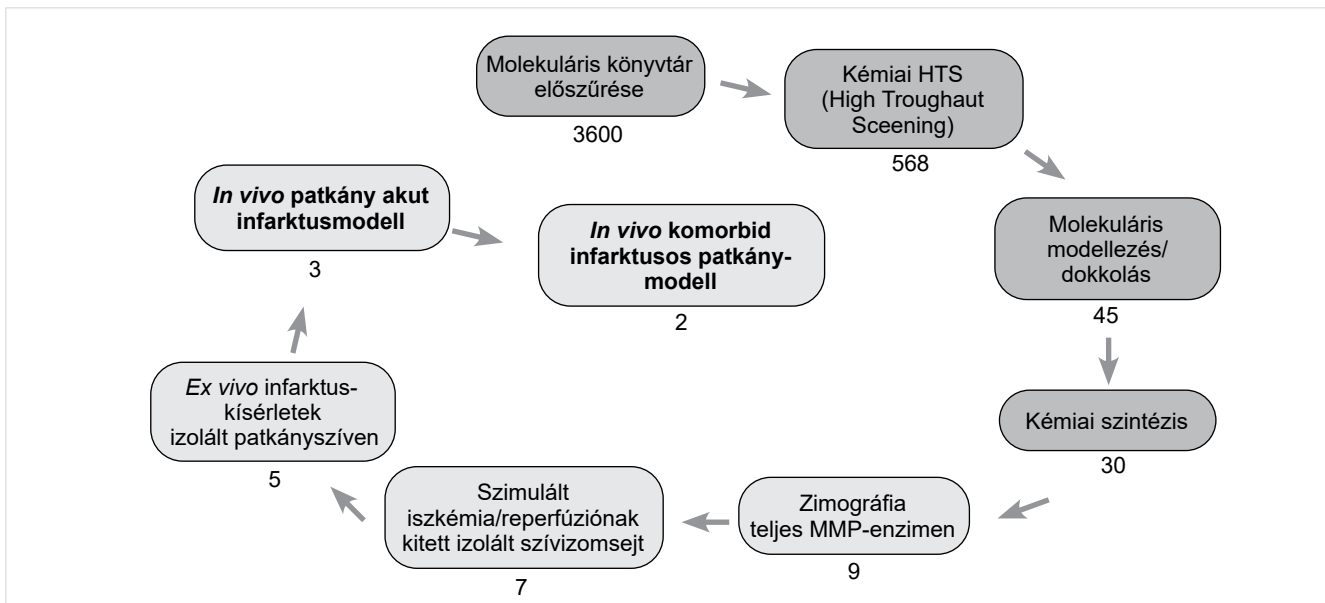
A clinicaltrials.org adatbázisa alapján egy további klinikai vizsgálat zajlik jelenleg a témában (NCT03508232; Doxycycline to Protect Heart Muscle After Heart Attacks), amelynek befejezése és eredménye várhatóan 2023 decemberében fog nyilvánosságra kerülni.

**Jelenleg repozicionálással alkalmazott gyógyszerek MMP-gátló hatása**

A fenti kísérleteken túl további vizsgálatok folynak azzal kapcsolatban, hogy az iszkémiás szívbetegeknél jelenleg is alkalmazott gyógyszerek milyen hatással vannak az MMP-2-re; az ismert hatásaik mellett vajon van-e MMP-gátló tulajdonságuk is?

Az egyik ilyen tanulmány a spironolakton hatását vizsgálta akut dekompenzált szívelégtelenségben (45). A spironolakton-kezelés hatására nagyobb mértékben csökkent az MMP-2 mennyisége a kontrollcsoportéhoz képest, ez a változás azonban nem érte el a szignifikancia határát. A levosimendan csökkentette az MMP-2 mennyiségét krónikus szívelégtelenség akut dekompenzációja során, ami vélhetőleg pozitívan befolyásolja az extracelluláris mátrix remodelációját (46). Érdekes módon az N-acetilcisztein is csökkenti az MMP-2 és MMP-9 mennyiségét akut miokardiális infarktuson átesett betegekben, továbbá csökkentette a hospitalizáció idejét, valamint a reinfarktus előfordulását (47).

A statinok közül a pravastatinról (48) és az atorvastatinról (49) mutatták ki, hogy csökkentik az MMP-2 mennyiségét akut miokardiális infarktust követően, illetve akut szívelégtelenségben. Kutatócsoportunk az MMP-2 és MMP-9 aktivitását mérve nem talált szignifikáns különbséget a statinnal kezelt betegeknél egy-ér koronáriabetegekben (29).



4. ÁBRA. Az általunk kivitelezett preklinikai gyógyszerfejlesztés lépései 2006–2019 között. Sötét szürke színnel a vegyészeti/kémiai szakértelmet és technikákat igénylő lépéseket, míg világos szürke színnel a biológiai *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* kísérletsozokat tüntettük fel. A számok az egyes kísérletsozokban tesztelt molekulák számát jelzik. Az ábra egy korábbi közleményünkben bemutatott folyamatábra módosítása által készült (53)

### Kutatócsoportunk gyógyszerfejlesztési megoldása a mérsékelt és szelektív MMP-2-gátlásra

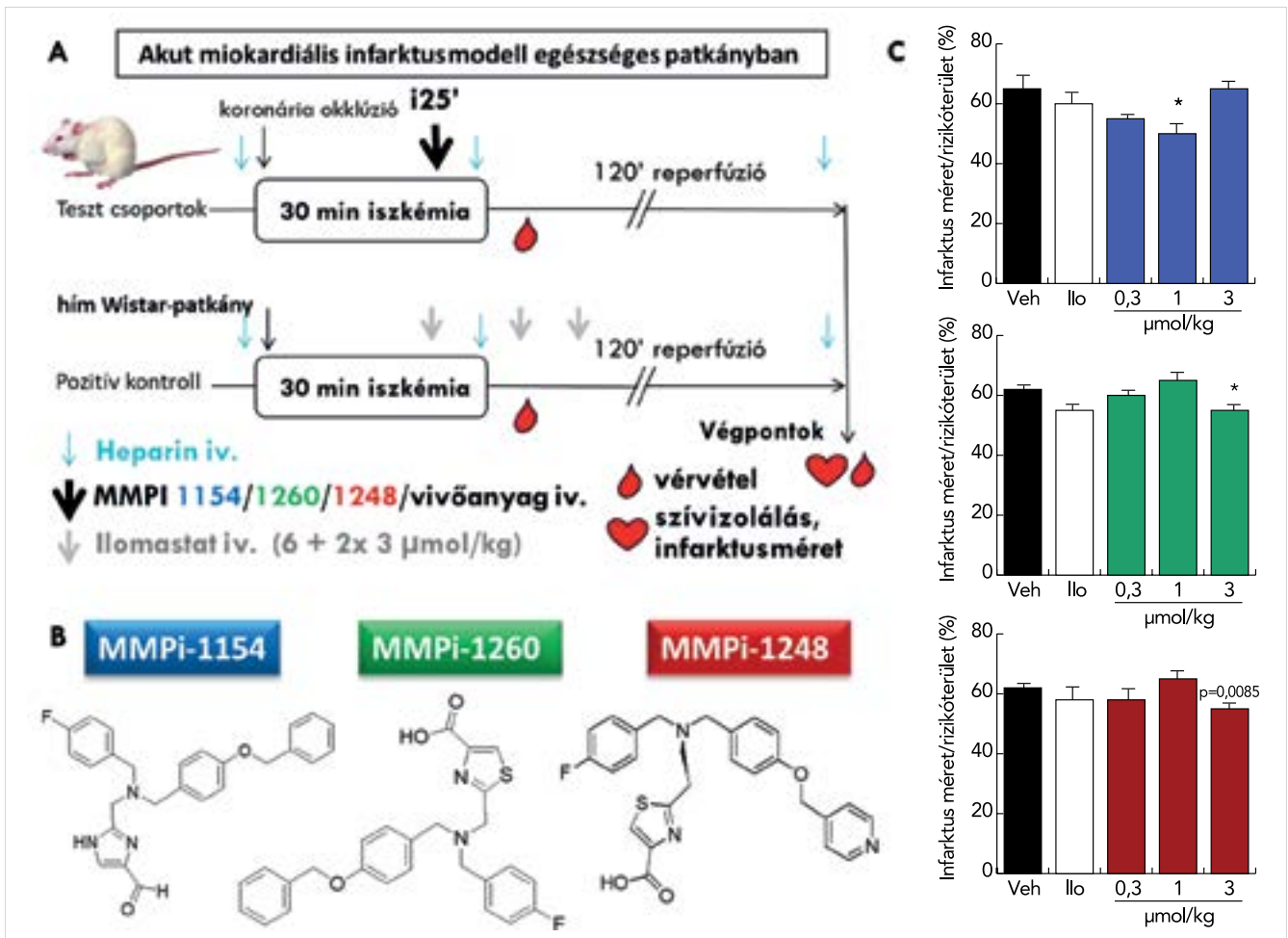
A hidroxámsav típusú MMPI, a PG-116800 klinikai bukását követő kutatások szelektív vegyületek kifejlesztésére összpontosítottak, amelyek képesek különbséget tenni az MMP-család különböző tagjai között, kihasználva ezzel a cinkmegkötő hidroxamátcsoporttól eltérő funkciós csoportokat, doméneket (50). Korábban azt is kimutattuk, hogy nincs szükség az MMP-2 teljes gátlására a kardioprotektív hatás eléréséhez, mivel a MMP-2 mérsékelt (~20-25%-os) gátlása is elegendő aktivitásának csökkentéséhez, valamint az infarktus méretének csökkentéséhez normo- és hyperlipidaemiás izolált patkányszíveken (51), majd későbbi tanulmányunkban az AMI *in vivo* patkánymodelljében is (52). Következésképpen céljaink között szerepelt olyan új MMP-2-gátlók kifejlesztése, amelyek erős anti-iszkémiás hatékonysággal és magas MMP-2-szelektivitással rendelkeznek, azonban az MMP-2 aktivitását csak részlegesen gátolják.

Mivel ismert volt, hogy az MMP-k aktív centrumában elhelyezkedő cinkatom gátlása nem alkalmas szelektív inhibitorok kifejlesztésére, alternatív megközelítést alkalmaztunk a molekulatervezésben. Az MMP-k konfigurációja ún. zsebeket és alzsebeket alakít ki a molekula térszerkezetében. Ezen (al)zsebek jellemzőinek jelentős különbségei és a kötő/aktív helyek eltérő tulajdonságai lehetővé teszik az egyes MMP-izoformák könnyű megkülönböztetését, ezáltal lehetővé téve az egyes MMP-izoenzimek szelektív gátlását. Az MMP-2 esetében az S1' jelzésű zseb főként hidrofób és vi-

szonylag nagy, míg az MMP-1 esetében rövid és sekély. Az S1'-zseb térfogatának növelése megváltoztathatja az enzim aktivitásprofilját, és némi szelektivitást tesz lehetővé az MMP-1-gyel szemben. Kutató konzorciumunk kémikusai olyan tiazol- és imidazol-karbonsav származékokat hoztak létre, amelyek az MMP-2 S1' zsebébe nagy affinitással illeszkedtek ezáltal részleges gátlást hozva létre az enzim aktivitásában (53).

Csoportunk komplex szűrési folyamatot alkalmazott olyan jelöltek azonosítására, amelyek az MMP-2 gátlásán keresztül csökkenthetik a szívizom akut iszkémia/reperfúziós károsodását. Komplex szűrési protokollunk során a tiazol- és imidazol-karbonsav származékok virtuális szűrését dokkolási számításokkal kombináltuk, majd az MMP-2 katalitikus doménjének felhasználásával nagy áteresztőképességű (HTS, high throughput screening) szűrést végeztünk. A következő lépésben a gátló hatást a szívszövetből izolált teljes hosszúságú MMP-2-enzimen igazoltuk. Végül a kiválasztott molekulák kardioprotektív hatását biológiai modelleken, elsőként szimulált iszkémiának és reoxigenizációnak kitett újszülött patkányból izolált szívizomsejt-tenyészetben teszteltük, majd a sejtek életképességét leghatékonyabban növelő molekulákat izolált patkányszíveken kialakított *ex vivo* akut infarktuszmodellben vizsgáltuk (4. ábra, ld. részletesebben az [53] referenciát).

A sejtenyészeteken és *ex vivo* patkányszíven végzett kísérletek alapján leghatékonyabbnak bizonyult molekulák iszkémia ellenes kardioprotektív hatását *in vivo* állatmodellekben teszteltük tovább (54). Normál koleszterinszinttel és metabolizmussal rendelkező, felnőtt hím Wistar-patkányokon 30 perces koszorúér-elzárás, majd 120 perces reperfúziót alkalmaztunk akut szívin-



**5. ÁBRA.** A preklinikai vizsgálatok protokollja (A), a tesztelt új típusú, szelektív MMP-2-gátló molekulák szerkezeti képlete (B), és egészséges patkányban létrehozott akut miokardiális infarktusmodellben elért infarktus méret csökkentő, kardioprotektív hatása (C). Kék színű oszlopokkal az MMPi-1154, zölddel az MMPi-1260, míg bordó színűvel az MMPi-1248 kódjelű testanyagok eredményeit mutatjuk be. A statisztikai analízis egyutas varianciaanalízissel történt, majd Fisher LSD poszthoc tesztet alkalmaztunk a részletes, vivőanyaghoz hasonlítás érdekében. A diagramokon az átlag ± standard hibát (S.E.M.) ábrázoltuk, \* $p < 0,05$  vs. vivőanyag (Veh);  $n = 10-13$ . (Veh, vehicle, vivőanyag; Ilo, ilomastat, pozitív kontroll MMP-gátló vegyület) Eredeti ábra: ref. (54)

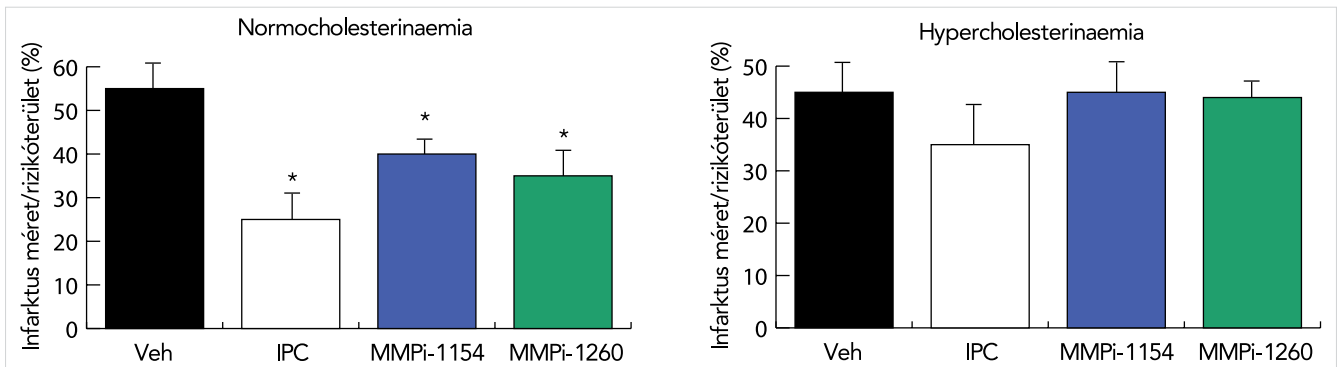
infarktus kiváltása céljából. Az MMPI-ket (MMPI-1154 és -1260) 0,3, 1 és 3  $\mu\text{mol/kg}$ , MMPi-1248 1, 3 és 10  $\mu\text{mol/kg}$  dózisban az iszkémia 25. percében intravénásan adtuk be (5. ábra, A panel). Az infarktus/rizikó terület méretét a reperfúzió végén minden csoportban standard Evans-kék és 2,3,5-trifeniltetrazolium-klorid (TTC) festéssel határoztuk meg. A szívizom mikrovaszkuláris elzáródását (MVO) pedig tioflavin-S festéssel határoztuk meg. Az MMPi-1154 1  $\mu\text{mol/kg}$ , az MMPi-1260 pedig 3  $\mu\text{mol/kg}$  dózisban jelentősen csökkentette az infarktus méretét fiziológias lipidszint mellett, míg az MMPi-1248 infarktus méret csökkentő hatása nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (5. ábra, C panel).

Külön kísérletsorozatban 12 hetes diétával (2% koleszterin, 0,25% koleszterinsav) hypercholesterinaemiát idéztünk elő, majd a patkányokat ugyanannak az AMI-protokollnak vetettük alá, és a normocholesterinaemiás állatokban legnagyobb hatékonyságot mutató MMPI-k egyszeri dózisát a hypercholesterinaemiás

állatokon vizsgáltuk. Életkor-arányos (age-matched) kontrollként 12 hétig normál rágcsálótáppal etetett, azonos életkorú patkányokat használtunk. Mind a két tesztelt MMPI, mind az iszkémiás prekondicionálás (IPC) mint pozitív kontroll jelentősen csökkentette az infarktus méretét a normocholesterinaemiás állatokban; ez a hatás azonban nem volt megfigyelhető a hypercholesterinaemiás állatokban egyik MMPI és az IPC esetében sem [6. ábra, illetve lásd részletesen az (54) referenciát]. A hypercholesterinaemiás állatokban egyedül az MVO mértékében tudtunk csökkenést megfigyelni az IPC hatására, a két MMPI azonban ezen paraméter esetén sem mutatott eltérést a kontrollhoz képest.

### Következtetések

A MMP-2 kórélettani szerepe a szívizom iszkémia-reperfúziós károsodásában, illetve diagnosztikus és/vagy



**6. ÁBRA.** A normál állapotban kardioprotektív aktivitást mutató, új típusú, szelektív MMP-2-gátló molekulák infarktus méretre gyakorolt hatása hypercholesterinaemiás, és annak megfelelő korú (age-matched) kontroll, akut miokardiális infarktusnak kitétt patkányokon. A diagramokon az átlag ± standard hibát (S.E.M.) ábrázoltuk, \* $p < 0,05$  vs. vivőanyag (Veh);  $n = 10-13$ . (Veh, vehicle, vivőanyag; IPC, iszkémiás prekondicionálás, pozitív kontroll). Eredeti ábra: ref. (54)

terápiás célpontként való klinikai felhasználása az akut miokardiális infarktus korai, vagy késői szakaszában több mint 2 évtizede intenzíven kutatott terület. Kutatócsoportunk szinte a kezdetektől részt vesz az enzim diagnosztikus és terápiás felhasználásának fejlesztésében, és mára rendelkezik számos országban bejegyzett nemzetközi szabadalommal több molekulára, köztük a bemutatott három MMPI-re, amelyek közül kettő normál metabolizmusú patkányokban reprodukálható módon kardioprotektív hatást váltott ki a szívizom iszkémia/reperfúziós károsodása során. Továbbra is nyitott kérdés azonban az optimális MMP-2-gátlás megfelelő klinikai alkalmazása akut infarktusos betegekben. Annak ellenére, hogy a preklinikai adatok bőségesen, több forrásból megerősítve alátámasztják az MMP-2-gátlás létjogosultságát és pozitív hatásait a miokardiális iszkémia/reperfúziós károsodás mérséklésében, továbbra sincs megfelelő intenzitású fejlesztés és klinikai vizsgálat ezzel kapcsolatban. Az egyetlen gyógyszer, amellyel egy évtizede folynak klinikai vizsgálatok STEMI-betegek bevonásával, a doxiciklin, amelyről ellentmondásos közlemények érhetők el az irodalomban. Ennek ellenére jelenleg is van aktívan zajló klinikai vizsgálat a doxiciklinnel kiváltott MMP-2-gátlás pozitív hatásainak bizonyítására STEMI-betegekben. Amennyiben sikerül új kémiai partnert és megfelelő pályázati forrást bevonni kutatásunkba, kutatócsoportunk is folytatja a szelektív és mérsékelt MMP-2-gátlást kifejtő molekulák fejlesztését és preklinikai tesztelését, valamint a küzdelmet az infarktusos betegek életminőségének és élettartamának javítása érdekében.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönetünket szeretnénk kifejezni a Pharmahungary 2000 Kft. vezérigazgatójának, prof. dr. Ferdinandy Péternek, valamint a cég valamennyi korábbi és jelenlegi alkalmazottjának, továbbá a TargetEx Kft. korábbi vezérigazgatójának, dr. Cseh Sándornak, illetve a jelenlegi cégvezetőnek, dr. Lőrincz Zsoltnak és a vállalat egyik fő tanácsadójának, dr. Dormán Györgynek, akiknek ál-

dozatos munkája nélkül a közleményben részletezett saját eredmények nem valósultak volna meg. Együttal ezt a közleményt dr. Cseh Sándor emlékének ajánljuk. Ezt a tanulmányt az RRF-2.3.1-21-2022-00003 „Nemzeti Szívlaboratórium, Magyarország” azonosítójelű projekt támogatta, amely az Európai Unió támogatásával valósult meg. A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) támogatta TÉT\_15\_IN-1-2016-0068, és GINOP-2.3.2-15-2016-00040 azonosító jelű pályázatokkal, valamint a kísérletek egy része a korábbi Nemzeti Fejlesztési Ügynökség NKFP\_06\_A1-MMP\_2006 azonosítójelű pályázati forrásából valósult meg. B.P.-t témavezetőként a Kooperatív Doktori Program (KDP-2020) keretében az Innovációs és Technológiai Minisztérium támogatta, valamint a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (bo\_481\_21) által is támogatott. B.P. szintén támogatást kapott az Emberi Erőforrások Minisztériuma által az ÚNKP-23-5-704 azonosítójelű Új Nemzeti Kiválósági Program pályázatból, valamint az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA-138223) forrásaiból.

### Nyilatkozat

B.P. a Pharmahungary 2000 Kft. alkalmazottja, azonban a szerzők egybehangzóan kijelentik, hogy az összefoglaló közlemény megírásával kapcsolatban nem áll fenn velük szemben pénzügyi vagy egyéb lényeges összeütkezés, összeférhetetlenségi ok, amely befolyásolhatja a közleményben bemutatott eredményeket, illetve az azokból levont következtetéseket vagy azok értelmezését.

### Irodalom

1. No author provided. Halálozások a gyakoribb halálokok és nem szerint, in [https://www.ksh.hu/stadat\\_files/nep/hu/nep0010.html](https://www.ksh.hu/stadat_files/nep/hu/nep0010.html). Budapest: Központi Statisztikai Hivatal Hungary; 2022.
2. No author provided. Main causes of mortality”, in Health at a Glance: Europe 2022: State of Health in the EU Cycle, in Health at a Glance: Europe 2022. 2022. OECD Publishing: Paris; <https://doi.org/10.1787/a72a34af-en>
3. Nilsson L, Hallen J, Atar D, et al. Early measurements of plasma matrix metalloproteinase-2 predict infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. Heart 2012; 98(1): 31–6. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2011-300079>



4. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94(6): 2493–503. <https://doi.org/10.1172/JCI117619>
5. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90(5): 520–30. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000013290.12884.a3>
6. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; 48(6): 1014–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>
7. Woolley DE, Glanville RW, Crossley MJ, Evanson JM. Purification of rheumatoid synovial collagenase and its action on soluble and insoluble collagen. *Eur J Biochem* 1975; 54(2): 611–22. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04173.x>
8. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, et al. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 1986; 261(14): 6600–5.
9. Bassiouni W, Ali Mam, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J* 2021; 288(24): 7162–7182. <https://doi.org/10.1111/febs.15701>
10. Murphy GM, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; 29(5): 290–308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
11. Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007; 152(2): 189–205. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707344>
12. Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, et al. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. *Am J Physiol* 1999; 277(2): H777–87. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.2.H777>
13. Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, et al. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 2002; 106(12): 1543–9. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000028818.33488.7b>
14. Hughes BG, Schulz R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(4): 424. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0424-y>
15. Cauwe B, Opdenakker G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010; 45(5): 351–423. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.501783>
16. Kupai K, Szucs G, Cseh S, et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 61(2): 205–9. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.011>
17. Lалу MM, Pasini E, Schulze CJ, et al. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J* 2005; 26(1): 27–35. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi007>
18. Bencsik P, Bartekova M, Gorbe A, et al. MMP Activity Detection in Zymograms. *Methods Mol Biol* 2017; 1626: 53–70. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_6)
19. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; 101(15): 1833–9. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.15.1833>
20. Ali MA, Cho WJ, Hudson B, et al. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2010; 122(20): 2039–47. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930222>
21. Van Eyk JE, Powers F, Law W, et al. Breakdown and release of myofibrillar proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res* 1998; 82(2): 261–71. <https://doi.org/10.1161/01.res.82.2.261>
22. Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(7): 1431–42. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0711>
23. Mizuno T, Yau TM, Weisel RD, et al. Elastin stabilizes an infarct and preserves ventricular function. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl): I81–8. <https://doi.org/10.1161/01.CIRCULATIONAHA.105.523795>
24. Rodriguez M, Cai WJ, Kostin S, et al. Ischemia depletes dystrophin and inhibits protein synthesis in the canine heart: mechanisms of myocardial ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38(5): 723–33. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.02.019>
25. Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(3): H1229–35. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00207.2003>
26. Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, et al. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 2005; 115(3): 599–609. <https://doi.org/10.1172/JCI22304>
27. Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, et al. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(4): H1847–60. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00434.2006>
28. Zhou HZ, Ma X, Gray MO, et al. Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358(1): 189–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.094>
29. Bencsik P, Sasi V, Kiss K, et al. Serum lipids and cardiac function correlate with nitrotyrosine and MMP activity in coronary artery disease patients. *Eur J Clin Invest* 2015; 45(7): 692–701. <https://doi.org/10.1111/eci.12458>
30. Muzzio ML, Miksztovcz V, Brites F, et al. Metalloproteinases 2 and 9, Lp-PLA(2) and lipoprotein profile in coronary patients. *Arch Med Res* 2009; 40(1): 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.10.011>
31. Spinale FG, Koval CN, Deschamps AM, et al. Dynamic changes in matrix metalloproteinase activity within the human myocardial interstitium during myocardial arrest and reperfusion. *Circulation* 2008; 118(14 Suppl): S16–23. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.786640>
32. Donnini S, Monti M, Roncone R, et al. Peroxynitrite inactivates human-tissue inhibitor of metalloproteinase-4. *FEBS Lett* 2008; 582(7): 1135–40. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.080>
33. Schulze CJ, Wang W, Suarez-Pinzon WL, et al. Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase-4 and matrix metalloproteinases during acute myocardial [correction of myocardial] ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 107(19): 2487–92. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000065603.09430.58>
34. Durrant JD, de Oliveira CA, McCammon JA. Pyrone-based inhibitors of metalloproteinase types 2 and 3 may work as conformation-selective inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 2011; 78(2): 191–8. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2011.01148.x>
35. Dorman G, Kocsis-Szommer K, Spadoni C, et al. MMP inhibitors in cardiac diseases: an update. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007; 2(3): 186–94. <https://doi.org/10.2174/157489007782418964>
36. Dorman G, Cseh S, Hajdu I, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: a critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility. *Drugs* 2010; 70(8): 949–64. <https://doi.org/10.2165/11318390-000000000-00000>
37. Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W, et al. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(1): 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.02.055>
38. Berman B, Perez OA, and Zell D. Update on rosacea and anti-inflammatory-dose doxycycline. *Drugs Today (Barc)* 2007; 43(1): 27–34. <https://doi.org/10.1358/dot.2007.43.1.1025697>
39. Caton J and Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res* 2011; 63(2): 114–20. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.12.003>
40. Hu J, Van den Steen PE, Sang QX, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(6): 480–98. <https://doi.org/10.1038/nrd2308>
41. Brown DL, Desai KK, Vakili BA, et al. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(4): 733–8. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000121571.78696.dc>
42. Schulze CJ, Castro MM, Kandasamy AD, et al. Doxycycline reduces cardiac matrix metalloproteinase-2 activity but does not ameliorate myocardial dysfunction during reperfusion in coronary artery bypass patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med* 2013; 41(11): 2512–20. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318292373c>
43. Cerisano G, Buonamici P, Valenti R, et al. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodeling: the TIPTOP trial. *Eur Heart J* 2014; 35(3): 184–91. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi420>
44. Noaman S, Neil C, O'Brien J, et al. UpStreAm doxycycline in ST-elevation myocardial infarction: targetinG infarct hEaling and Modulaton (SALVAGE-MI trial). *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2023; 12(3): 143–152. <https://doi.org/10.1093/ehjacc/zuac161>
45. Ferreira JP, Santos M, Oliveira JC, et al. Influence of spironolactone on matrix metalloproteinase-2 in acute decompensated heart failure. *Arq Bras Cardiol* 2015; 104(4): 308–14. <https://doi.org/10.5935/abc.20140205>
46. Tziakas DN, Chalikiak GK, Hatzinikolaou HI, et al. Levosimendan use reduces matrix metalloproteinase-2 in patients with decompensated heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005; 19(6): 399–402. <https://doi.org/10.1007/s10557-005-5417-5>
47. Talasaz AH, Khalili H, Fahimi F, et al. Effects of N-acetylcysteine on the cardiac remodeling biomarkers and major adverse events following acute myocardial infarction: a randomized clinical trial. *Am J Cardiovasc Drugs* 2014; 14(1): 51–61. <https://doi.org/10.1007/s40256-013-0048-x>
48. Nakaya R, Uzui H, Shimizu H, et al. Pravastatin suppresses the increase in matrix metalloproteinase-2 levels after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2005; 105(1): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2004.12.024>
49. Shirakabe A, Asai K, Hata N, et al. Immediate administration of atorvastatin decreased the serum MMP-2 level and improved the prognosis for acute heart failure. *J Cardiol* 2012; 59(3): 374–82. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2012.01.009>
50. Fisher JF, Mobashery S. Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(1): 115–36. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-7894-9>
51. Giricz Z, Lалу MM, Csonka C, et al. Hyperlipidemia attenuates the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning: role of matrix metalloproteinase-2 inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(1): 154–61. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.091140>
52. Bencsik P, Paloczi J, Kocsis GF, et al. Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. *Pharmacol Res* 2014; 80: 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.12.007>
53. Bencsik P, Kupai K, Gorbe A, et al. Development of Matrix Metalloproteinase-2 Inhibitors for Cardioprotection. *Front Pharmacol* 2018; 9: 296. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00296>
54. Gomori K, Szabados T, Kenyeres E, et al. Cardioprotective Effect of Novel Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Int J Mol Sci* 2020; 21(19). <https://doi.org/10.3390/ijms21196990>