

Иммуногистохимическая характеристика экспрессии маркеров MMP-9 и TIMP-1 в коре головного мозга при сахарном диабете 2 типа

В. А. Шаврин^{А,Е,Ф}, Ю. Н. Авраменко^{*В,С,Д}

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

А – концепция и дизайн исследования; В – сбор данных; С – анализ и интерпретация данных; D – написание статьи;
Е – редактирование статьи; F – окончательное утверждение статьи

Ключевые слова:

сахарный диабет, ангиогенез, MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1.

Запорожский медицинский журнал. 2020. Т. 22, № 4(121). С. 468-472

*E-mail: julija_avramenko@ukr.net

Цель работы – изучить особенности иммуногистохимической экспрессии MMP-9, TIMP-1, их отношения MMP/TIMP в коре головного мозга при сахарном диабете 2 типа.

Материалы и методы. Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое исследование секционного материала ткани головного мозга в 3 группах наблюдений: I группа – условного контроля без СД и цереброваскулярной патологии, II группа – умершие пациенты, болевшие дисциркуляторно-ишемической энцефалопатией (ДИЭ), III группа – умершие, болевшие СД 2 типа.

Результаты. Установлено возрастание экспрессии MMP-9 как при дисциркуляторно-ишемической энцефалопатии, так и при сахарном диабете 2 типа (MMP-9 – в группе условного контроля – 0,434 (0,339; 0,792) %, в группе ДИЭ – 0,652 (0,398; 1,103) %, в группе СД 2 типа – 0,829 (0,636; 1,034) %). Выявлено достоверное снижение экспрессии TIMP-1 при СД 2 типа (TIMP-1 – в группе условного контроля – 0,449 (0,254; 0,601) %, в группе ДИЭ – 0,444 (0,306; 0,688) %, в группе СД 2 типа – 0,278 (0,196; 0,554) %). При СД отмечается статистически достоверное ($p < 0,05$) возрастание соотношения MMP/TIMP, медиана данного показателя составила 2,732 (1,665; 4,643), показатель в группе условного контроля – 1,386 (0,618; 2,29), в группе ДИЭ – 1,528 (0,619; 3,056) ($p > 0,05$).

Выводы. Возрастание уровня экспрессии MMP-9 и снижение уровня экспрессии TIMP-1 в коре головного мозга при СД 2 типа способствует повышенной проницаемости ГЭБ и является важным звеном в патогенезе развития диабетической микроангиопатии.

Ключові слова:

цукровий діабет, ангиогенез, MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1.

Запорізький медичний журнал. 2020. Т. 22, № 4(121). С. 468-472

Імуногістохімічна характеристика експресії маркерів MMP-9 і TIMP-1 у корі головного мозку при цукровому діабеті 2 типу

В. О. Шаврін, Ю. М. Авраменко

Мета роботи – вивчити особливості імуногістохімічної експресії MMP-9, TIMP-1, їхнє співвідношення MMP/TIMP в корі головного мозку при цукровому діабеті 2 типу.

Матеріали та методи. Здійснили патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження секційного матеріалу тканини головного мозку у 3 групах спостережень: I група – умовного контролю без ЦД і цереброваскулярної патології, II група – померлі пацієнти, які хворіли на дисциркуляторно-ішемічну енцефалопатію (ДІЕ), III група – померлі, які хворіли на ЦД 2 типу.

Результати. Встановили зростання експресії MMP-9 як при дисциркуляторно-ішемічній енцефалопатії, так і при цукровому діабеті 2 типу (MMP-9 – у групі умовного контролю – 0,434 (0,339; 0,792) %, у групі ДІЕ – 0,652 (0,398; 1,103) %, у групі ЦД 2 типу – 0,829 (0,636; 1,034) %). Виявили вірогідне зниження експресії TIMP-1 при ЦД 2 типу (TIMP-1 – у групі умовного контролю – 0,449 (0,254; 0,601) %, у групі ДІЕ – 0,444 (0,306; 0,688) %, у групі ЦД 2 типу – 0,278 (0,196; 0,554) %). При ЦД відзначається статистично вірогідне ($p < 0,05$) зростання співвідношення MMP/TIMP, медіана становила 2,732 (1,665; 4,643), в групі умовного контролю цей показник становив 1,386 (0,618; 2,29), у групі ДІЕ – 1,528 (0,619; 3,056) ($p > 0,05$).

Висновки. Зростання рівня експресії MMP-9 і зниження рівня експресії TIMP-1 у корі головного мозку при ЦД 2 типу спричиняє підвищену проникність ГЕБ та є важливою ланкою в патогенезі розвитку діабетичної мікроангіопатії.

Key words:

diabetes mellitus, angiogenesis, MMP-9, TIMP-1, MMP-9/TIMP-1.

Zaporozhye medical journal 2020; 22 (4), 468-472

Immunohistochemical characteristics of MMP-9 and TIMP-1 markers expression in the cerebral cortex in diabetes mellitus type 2

V. O. Shavrin, Yu. M. Avramenko

Aim – to study the features of immunohistochemical expression of MMP-9, TIMP-1, MMP/TIMP ratio in the cerebral cortex in diabetes mellitus type 2.

Materials and methods. A pathomorphological and immunohistochemical study of the section material of brain tissue conducted in 3 groups of observations: group I – control without diabetes and cerebrovascular pathology, group II – deceased patients with dyscirculatory-ischemic encephalopathy (DIE), group III – deceased patients with diabetes mellitus type 2 (DM).

Results. Increased expression of MMP-9 in DIE group and in deceased patients with DM type 2 (MMP-9 in the control group – 0.434 (0.399; 0.792) %, in DIE group – 0.652 (0.398; 1.103) %, in DM type 2 group – 0.829 (0.636; 1.034) %) has been found. A significant decrease in TIMP-1 expression was detected in DM type 2 (TIMP-1 – in the control group 0.449 (0.254; 0.601) %, in

group of DIE – 0.444 (0.306; 0.688) %, in DM type 2 group – 0.278 (0.196; 0.554) %. A statistically significant increase in the MMP/TIMP ratio ($P < 0.05$) was observed in DM, the median was 2.732 (1.665; 4.643); this indicator was 1.386 (0.618; 2.29) in the control group and 1.528 (0.619; 3.056) ($P > 0.05$) in DIE group.

Conclusions. An increase in the level of MMP-9 expression and a decrease in the expression level of TIMP-1 in the cerebral cortex in diabetes mellitus type 2 promote increased blood-brain barrier permeability and is an important link in the pathogenesis of diabetic microangiopathy.

Матричные металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMPs) являются кальцийзависимыми цинк-эндопептидазами суперсемейства метцинцин, экспрессируются как неактивные зимогены с пропептидным доменом (pro-MMPs), который должен быть удален для активации. MMPs играют значительную роль в физиологических процессах, включая морфогенез ткани, миграцию клеток и ангиогенез, а также участвуют в патофизиологических процессах, включая заживление ран, воспаление, онкологию [1]. Матричная металлопротеиназа-9 (MMP-9) – важный фактор в развитии и пластичности ЦНС, экспрессируется как в центральной, так и в периферической нервной системе [2]. От соотношения активности MMPs и их тканевых ингибиторов (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) зависит динамичное постоянство состава внеклеточного молекулярно-волоконного матрикса и базальных мембран.

Нарушение регуляции MMP-9 и TIMPs может способствовать развитию сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) [3]. Экспериментальные данные *in vivo* и *in vitro* показывают, что гипергликемическая диабетическая среда может вызывать изменение экспрессии генов MMPs и вносить вклад в дисбаланс гомеостаза сосудистого матрикса [4], может индуцировать выработку активных форм кислорода (АФК), что приводит к повышению активности матриксной металлопротеиназы-9 [5]. Многочисленные исследования показывают, что MMPs играют существенную роль в геморрагической трансформации очагов ишемического повреждения головного мозга, одновременно вызывая изменения уровня TIMP-1 [6].

На экспериментальных моделях ишемии головного мозга было показано, что TIMP обладает протективными свойствами по отношению к гематоэнцефалическому барьеру (ГЭБ), ингибируя активность MMP-9 [7]. Баланс MMP/TIMP имеет решающее значение в гомеостазе и ремоделировании внеклеточного матрикса, который необходим для разнообразных как физиологических процессов, включая рост клеток, миграцию, апоптоз, так и патологических. Роль дисбаланса MMP/TIMP недостаточно изучена в условиях хронического ишемического повреждения головного мозга человека, в частности на фоне диабетической ангиопатии.

Цель работы

Изучить особенности иммуногистохимической экспрессии MMP-9, TIMP-1, отношения MMP/TIMP в коре головного мозга при сахарном диабете 2 типа.

Материалы и методы исследования

Проведено патоморфологическое и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование ткани головного мозга на секционном материале. Изучено 30 секционных слу-

чаев, разделенных на основании результатов анализа анамнестических и патологоанатомических данных на три группы. Первую группу (V1) составили 10 умерших больных от различных заболеваний без наличия признаков СД и цереброваскулярной патологии – они использованы в качестве условного контроля. Во вторую группу (V2), учитывая очень частое сочетание СД с атеросклерозом и его церебральными проявлениями, для оценки их влияния на результат исследования СД, отобраны 10 случаев смерти от тяжелой цереброваскулярной патологии (дисциркуляторно-ишемическая энцефалопатия на почве стенозирующего атеросклероза – ДИЭ) без каких-либо проявлений СД. В третью группу (V3) вошли 10 умерших больных в условиях наличия клинически и морфологически выраженного СД без признаков иной цереброваскулярной патологии.

Кусочки коры головного мозга фиксировали в 10 % забуференном формалине и заливали в парафин. Особенности гистологического строения исследуемых образцов изучали в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. ИГХ-исследование проводили по стандартной методике, предусмотренной производителем антител. Использовали поликлональные антитела Rb a-Hu MMP-9 (92 kDa Collagenase IV) («Thermo Fisher Scientific Inc.», США), моноклональные антитела специфического тканевого ингибитора металлопротеаз Mo TIMP-1 Ab-2 Clone 102D1 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США).

Результаты иммуногистохимической реакции оценивали в стандартизованном поле зрения микроскопа Scope. A1 «Carl Zeiss» (ФРГ) и камерой Progres Gryphax Jenoptik 60N-C1"1,0x426114 (ФРГ) при увеличении $\times 200$, в каждом случае анализ проводили в 5 полях зрения с помощью программы Видеотест – Морфология 5.2.0.158 (ООО Видеотест, РФ), уровень экспрессии маркеров оценивали в μm^2 . Оценка результатов проводилась по показателям относительной площади экспрессии ($S_{\text{отн}}$, %). Относительную площадь экспрессии ($S_{\text{отн}}$, %) рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади поля зрения. Также для оценки нарушения баланса тканевого гомеостаза оценивали соотношение MMP/TIMP [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета Statistica® for Windows 13.0 (StatSoft Inc., лицензия № JPZ8041382130ARCN10-J). Вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q1; Q3); сравнение между двумя группами наблюдений проводили при помощи критерия Манна–Уитни; корреляционный анализ проведен с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты считали статистически значимыми на уровне 95 % ($p < 0,05$).

Результаты

В результате ИГХ-исследования установлено, что цитоплазматическая экспрессия MMP-9 обнаружива-

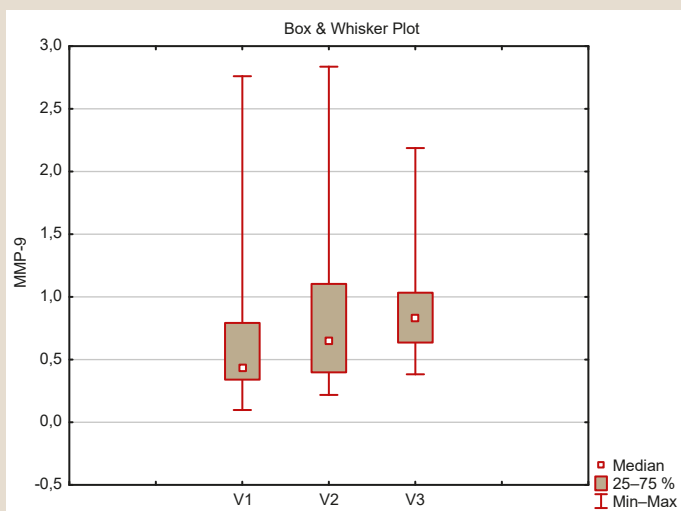


Рис. 1. Показатели уровня экспрессии MMP-9 в группах сравнения: V1 – контроль, V2 – ДИЭ, V3 – группа СД 2 типа.

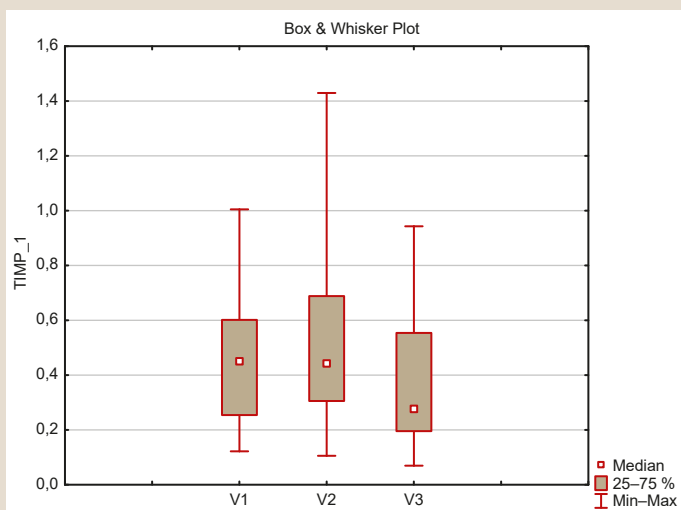


Рис. 2. Показатели уровня экспрессии TIMP-1 в группах сравнения: V1 – контроль, V2 – ДИЭ, V3 – группа СД 2 типа.

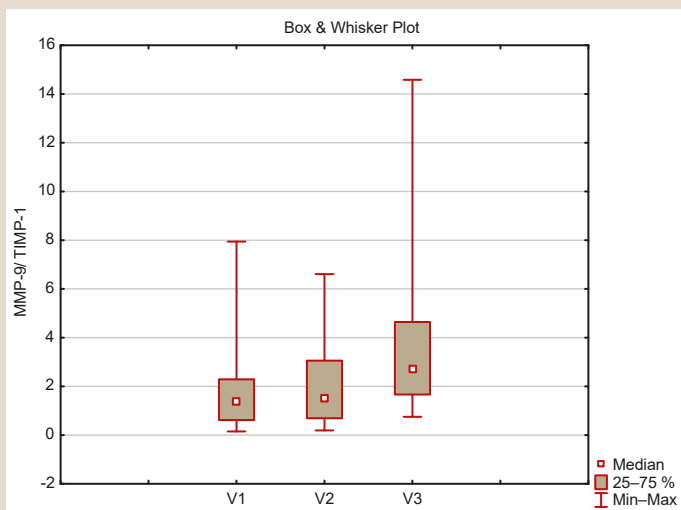


Рис. 3. Показатели отношения MMP/TIMP-1 в группах сравнения: V1 – контроль, V2 – ДИЭ, V3 – группа СД 2 типа.

Таблица 1. Корреляционные связи между показателями экспрессии MMP-9 и TIMP-1 в группах сравнения

	MMP-9	TIMP-1
контроль		
MMP-9	1,000	0,206
TIMP-1	0,206	1,000
ДИЭ		
MMP-9	1,000	-0,048
TIMP-1	-0,048	1,000
СД		
MMP-9	1,000	-0,102
TIMP-1	-0,102	1,000

ется в клетках эндотелия, нейронах и микроглии коры головного мозга. В группе условного контроля уровень экспрессии составляет 0,434 (0,339; 0,792) %, в группе с ДИЭ отмечено возрастание этого показателя в 1,5 раза – 0,652 (0,398; 1,103) %, ($p > 0,05$). В группе СД 2 типа медиана данного показателя составила 0,829 (0,636; 1,034) %, что статистически достоверно ($p < 0,05$) в 1,9 раза больше по сравнению группой условного контроля, но недостоверно ($p > 0,05$) в 1,27 раза больше, чем в группе ДИЭ (рис. 1).

Согласно полученным данным, цитоплазматическая экспрессия TIMP-1 обнаруживается в клетках эндотелия, астроцитах и микроглии коры головного мозга. В группе условного контроля уровень экспрессии составляет 0,449 (0,254; 0,601) %, в группе с ДИЭ установлено незначительное снижение этого показателя – 0,444 (0,306; 0,688) %. В группе СД 2 типа определяется статистически достоверное снижение экспрессии TIMP-1, медиана этого показателя составила 0,278 (0,196; 0,554) %, что в 1,77 раза меньше по сравнению с контролем и в 1,6 раза меньше группы ДИЭ ($p < 0,05$), (рис. 2).

Корреляционный анализ, проведенный между группами сравнения, не выявил статистически достоверных связей между показателями экспрессии MMP-9 и TIMP-1. Результаты представлены в таблице 1.

В результате расчета отношения MMP/TIMP в группах сравнения установлено: в группе условного контроля этот показатель составил 1,386 (0,618; 2,29), в группе ДИЭ наблюдается тенденция к увеличению (статистически недостоверное) MMP/TIMP – медиана составила 1,528 (0,619; 3,056) ($p > 0,05$). В группе СД отмечается статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение данного показателя 2,732 (1,665; 4,643), что в 1,97 раза превышает значение группы условного контроля и в 1,79 раза – группы ДИЭ (рис. 3).

Обсуждение

Согласно полученным данным, СД 2 типа характеризуется достоверно более высокой экспрессией MMP-9 [0,829 (0,636; 1,034) %] в сравнении с группой условного контроля (рис. 1). Полученные показатели согласуются с литературными сведениями. Так, по данным Turner и Sharp, 2016, наблюдается повышение уровня MMP-9, выявляемого как в плазме больных с ишемическим инфарктом головного мозга, так и в экспериментальных моделях животных с острой церебральной ишемией [9]. Эти изменения MMP-9 связывают с воздействием реперфузионного повреждения, оксидативного стресс-

са, активацией тканевого активатора плазминогена (tPA-activation), а также продукцией нейтрофилами и макрофагами pro-MMP-9 [10]. Zhang et al., 2017 отмечают возможность воздействия церебральной ишемии на экспрессию матричных металлопротеиназ при диабете. Метаболические нарушения, вызванные диабетом, изменяют структуру и функцию базальной мембраны, что приводит к аномальной деградации и регенерации сосудистой базальной мембраны [6]. Гипергликемия увеличивает как окислительный стресс, так и активность MMP-9, что приводит к деградации белков плотных контактов церебральных микрососудов и усугубляет дисфункцию гематоэнцефалического барьера [11]. В работе Zhang et al., 2015 подчеркивается, что мутация промотора гена металлопротеиназы-9 (rs 3918–242) снижает риск диабетических микрососудистых осложнений [12].

Установлена тенденция к снижению экспрессии TIMP-1 в исследуемых группах по сравнению с группой условного контроля. При СД уровень экспрессии TIMP-1 статистически достоверно ниже ($p < 0,05$) группы условного контроля и ДИЭ [0,278 (0,196; 0,554) %]. Данные научной литературы в отношении экспрессии TIMP-1 у больных с СД 2 типа неоднозначны. Так, большинство исследователей утверждают, что в остром периоде инфаркта головного мозга при диабете и без него уровень TIMP-1 повышается (как компенсаторная реакция на повышенный уровень циркулирующих MMPs) для поддержания баланса между протеазами и ингибиторами [13]. В то же время при развитии диабетической ретинопатии, остро инфаркта миокарда у больных с СД, а также при развитии диабетической стопы отмечается снижение уровня TIMP-1 в плазме крови [14–16]. В работе и Nagy et al., 2016 показано, что ишемическое повреждение и последующее восстановление ЦНС может привести как к увеличению MMPs, так и к снижению уровня TIMP у пациентов с инсультом или транзиторной ишемией [16]. По данным Moore и Crocker, в условиях патологии повышенная экспрессия MMP ведет к общему увеличению MMP-опосредованного протеолиза, что также приводит к истощению белков TIMP, доступных для обеспечения рецептор-опосредованной передачи сигналов, из-за чего снижается уровень экспрессии TIMP [8]. В исследовании Piccardi et al., 2015 показано, что у мышей с выключенным TIMP-1 определяется сверхэкспрессия MMP-9, усиление проницаемости ГЭБ и ишемическое повреждение головного мозга [17]. Такие неоднозначные данные, по-видимому, связаны с разными способами получения материала для измерения уровня маркера: так, в подавляющем большинстве исследований уровень изменения TIMP-1 определяли либо в экспериментальных моделях животных, либо в плазме крови больных. Наше исследование выполнено на секционном материале, и уровень экспрессии маркеров оценивался непосредственно в ткани головного мозга. Еще одной возможной причиной различия полученных результатов послужило исследование разных видов ишемического повреждения.

Установлено, что отношение MMP/TIMP при СД 2 типа значительно больше, чем в группах сравнения ($p < 0,05$), что указывает на увеличение протеолитической активности MMP и наличие стойкого дисбаланса в гомеостазе ткани головного мозга. По данным Satoru Ikemoto

et al., 2018, соотношение MMP-9/TIMP-1 отражает степень повреждения гематоэнцефалического барьера [18], что определяет выраженность геморрагической трансформации и отека ткани мозга при ишемическом повреждении.

Выводы

1. При сахарном диабете 2 типа в коре головного мозга отмечается возрастание экспрессии MMP-9 в сравнении с условной группой контроля и группой ДИЭ.
2. Уровень экспрессии TIMP-1 при СД 2 типа достоверно ниже по сравнению с группой условного контроля и группой ДИЭ.
3. Отношение MMP/TIMP при СД 2 типа значительно больше групп сравнения, что отражает степень протеолитического дисбаланса и нарушения гомеостаза ткани головного мозга.
4. Возрастание уровня экспрессии MMP-9 и снижение уровня экспрессии TIMP-1 в коре головного мозга при СД 2 типа способствует повышенной проницаемости ГЭБ и является важным звеном в патогенезе диабетической микроангиопатии.

Перспективы дальнейших исследований. Изучение других звеньев патогенеза, задействованных в процессе патологического ангиогенеза в коре головного мозга при сахарном диабете 2 типа.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках НИР Запорожского государственного медицинского университета «Закономерности формирования метаболических нарушений, нейроэндокринного и вегетативного дисбалансов в патогенезе экспериментальной артериальной гипертензии разного генеза», № госрегистрации 0114U000966.

Конфликт интересов: отсутствует.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 08.01.2020

Після доопрацювання / Revised: 20.01.2020

Прийнято до друку / Accepted: 18.03.2020

Сведения об авторах:

Шаврин В. А., д-р мед. наук, профессор каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.
Авраменко Ю. Н., ассистент каф. патологической анатомии и судебной медицины, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Відомості про авторів:

Шаврін В. О., д-р мед. наук, професор каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.
Авраменко Ю. М., асистент каф. патологічної анатомії і судової медицини, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Information about authors:

Shavrin V. O., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine.
Avramenko Yu. M., MD, Assistant of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine.

Список литературы

- [1] Rempe R. G., Hartz A. M. S., Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016. Vol. 36. Issue 9. P. 1481-1507. <https://doi.org/10.1177/0271678X16655551>
- [2] Reinhard S. M., Razak K., Ethell I. M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015. Vol. 9. P. 280. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00280>
- [3] Wadood S. A., Shawk R., Hashem, R. Variants of MMP-9 and TIMP-1 levels could be a predictor of an early development of cardiovascular diseases in type 2 Diabetes among Iraqi patients. *Iraqi Journal of Science*. 2015. Vol. 56. Issue 1C. P. 622-632.
- [4] Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats / P. N. de Senna et al. *Brain research*. 2015. Vol. 1618. P. 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.026>
- [5] Association between Increased Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Levels with Hyperglycaemia Incidence in Acute Ischemic Stroke Patients / I. Setyopranoto et al. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2018. Vol. 6. Issue 11. P. 2067-2072. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.459>
- [6] Zhang J.-X., Zhang Z.-Y., Cheng, Y. Elevated MMP-1 and TIMP-1 are related with acute cerebral infarction patients with diabetes mellitus. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2017. Vol. 10. Issue 12. P. 16555-16561.
- [7] Unbalanced Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Ratios Predict Hemorrhagic Transformation of Lesion in Ischemic Stroke Patients Treated with Thrombolysis: Results from the MAGIC Study / B. Piccardi et al. *Frontiers in neurology*. 2015. Vol. 6. P. 121. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00121>
- [8] Moore C. S., Crocker S. J. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *The American Journal of Pathology*. 2012. Vol. 180. Issue 1. P. 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.008>
- [9] Turner R. J., Sharp F. R. (2016). Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Vol. 10. P. 56. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00056>
- [10] MMP (Matrix Metalloprotease)-9-Producing Monocytes Enable T Cells to Invade the Vessel Wall and Cause Vasculitis / R. Watanabe et al. *Circulation Research*. 2018. Vol. 123. Issue 6. P. 700-715. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313206>
- [11] Peres G. B., Jasiulionis M. G., Michelacci Y. M. Matrix Metalloproteases in Streptozotocin Model of Diabetes Mellitus. *Streptozotocin: Uses, Mechanism of Action and Side Effects* / ed. E. L. Gauthier. Nova Science Publishers, 2014. P. 81-98.
- [12] Matrix Metalloproteinase 9 Gene Promoter (rs 3918242) Mutation Reduces the Risk of Diabetic Microvascular Complications / Z. Zhang et al. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015. Vol. 12. Issue 7. P. 8023-8033. <https://doi.org/10.3390/ijerph120708023>
- [13] Serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels are associated with mortality in patients with malignant middle cerebral artery infarction / L. Lorente et al. *BMC Neurology*. 2015. Vol. 15. P. 111. <https://doi.org/10.1186/s12883-015-0364-7>
- [14] Kowluru R. A. Role of Matrix Metalloproteinase-9 in the Development of Diabetic Retinopathy and Its Regulation by H-Ras. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010. Vol. 51. Issue 8. P. 4320-4326. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4851>
- [15] Association of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels with diabetic foot ulcer in Egyptians with type 2 diabetes mellitus / G. Omar et al. *Journal of Medicine in Scientific Research*. 2018. Vol. 1. Issue 4. P. 266-270. https://doi.org/10.4103/jmisr.jmisr_80_18
- [16] Association between matrix metalloproteinase-9 and worsening heart failure events in patients with chronic heart failure / T. Morishita et al. *ESC Heart Failure*. 2017. Vol. 4. Issue 3. P. 321-330. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12137>
- [17] Perioperative time course of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), its tissue inhibitor TIMP-1 & S100B protein in carotid surgery / B. Nagy et al. *Indian Journal of Medical Research*. 2016. Vol. 143. Issue 2. P. 220-226. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.180212>
- [18] Elevated Serum MMP-9 and MMP/TIMP-1 Ratio in Patients with Migrainous Infarction and Hemiplegic Migraine / S. Ikemoto et al. *Journal of Neurology and Neuroscience*. 2018. Vol. 9. Issue 6. P. 278. <https://doi.org/10.21767/2171-6625.1000278>
- [2] Reinhard, S. M., Razak, K., & Ethell, I. M. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, Article 280. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00280>
- [3] Wadood, S. A., Shawk, R., & Hashem, R. (2015). Variants of MMP-9 and TIMP-1 levels could be a predictor of an early development of cardiovascular diseases in type 2 Diabetes among Iraqi patients. *Iraqi Journal of Science*, 56(1C), 622-632.
- [4] de Senna, P. N., Xavier, L. L., Bagatini, P. B., Saur, L., Galland, F., Zanotto, C., Bernardi, C., Nardin, P., Gonçalves, C. A., & Achaval, M. (2015). Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier in diabetic rats. *Brain research*, 1618, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.026>
- [5] Setyopranoto, I., Malueka, R. G., Panggabean, A. S., Widyadharma, I., Sadewa, A. H., Lamsudin, R., & Wibowo, S. (2018). Association between Increased Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Levels with Hyperglycaemia Incidence in Acute Ischemic Stroke Patients. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 6(11), 2067-2072. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.459>
- [6] Zhang, J. -X., Zhang, Z. -Y., & Cheng, Y. (2017). Elevated MMP-1 and TIMP-1 are related with acute cerebral infarction patients with diabetes mellitus. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 10(12), 16555-16561.
- [7] Piccardi, B., Palumbo, V., Nesi, M., Nencini, P., Gori, A. M., Giusti, B., Pracucci, G., Tonelli, P., Innocenti, E., Sereni, A., Stocchi, E., Toni, D., Bovi, P., Guidotti, M., Tola, M. R., Consoli, D., Micieli, G., Tassi, R., Orlandi, G., Perini, F., ... Inzitari, D. (2015). Unbalanced Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Ratios Predict Hemorrhagic Transformation of Lesion in Ischemic Stroke Patients Treated with Thrombolysis: Results from the MAGIC Study. *Frontiers in neurology*, 6, Article 121. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00121>
- [8] Moore, C. S., & Crocker, S. J. (2012). An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *The American Journal of Pathology*, 180(1), 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.008>
- [9] Turner, R. J., & Sharp, F. R. (2016). Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, Article 56. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00056>
- [10] Watanabe, R., Maeda, T., Zhang, H., Berry, G. J., Zeisbrich, M., Brockett, R., Greenstein, A. E., Tian, L., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2018). MMP (Matrix Metalloprotease)-9-Producing Monocytes Enable T Cells to Invade the Vessel Wall and Cause Vasculitis. *Circulation Research*, 123(6), 700-715. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313206>
- [11] Peres, G. B., Jasiulionis, M. G., & Michelacci, Y. M. (2014). Matrix Metalloproteases in Streptozotocin Model of Diabetes Mellitus. In E. L. Gauthier (Ed.), *Streptozotocin: Uses, Mechanism of Action and Side Effects* (pp. 81-98). Nova Science Publishers.
- [12] Zhang, Z., Wu, X., Cai, T., Gao, W., Zhou, X., Zhao, J., Yao, J., Shang, H., Dong, J., & Liao, L. (2015). Matrix Metalloproteinase 9 Gene Promoter (rs 3918242) Mutation Reduces the Risk of Diabetic Microvascular Complications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 8023-8033. <https://doi.org/10.3390/ijerph120708023>
- [13] Lorente, L., Martín, M. M., Ramos, L., Cáceres, J. J., Solé-Violán, J., Argueso, M., Jiménez, A., Borroguero-León, J. M., Orbe, J., Rodríguez, J. A., & Páramo, J. A. (2015). Serum tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 levels are associated with mortality in patients with malignant middle cerebral artery infarction. *BMC Neurology*, 15, Article 111. <https://doi.org/10.1186/s12883-015-0364-7>
- [14] Kowluru, R. A. (2010). Role of Matrix Metalloproteinase-9 in the Development of Diabetic Retinopathy and Its Regulation by H-Ras. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(8), 4320-4326. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4851>
- [15] Omar, G., Sayed, G., Ghanem, A., Mohamed, N., & El-Kholly, M. (2018). Association of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels with diabetic foot ulcer in Egyptians with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medicine in Scientific Research*, 1(4), 266-270. https://doi.org/10.4103/jmisr.jmisr_80_18
- [16] Morishita, T., Uzui, H., Mitsuke, Y., Amaya, N., Kaseno, K., Ishida, K., Fukuoka, Y., Ikeda, H., Tama, N., Yamazaki, T., Lee, J. -D., & Tada, H. (2017). Association between matrix metalloproteinase-9 and worsening heart failure events in patients with chronic heart failure. *ESC Heart Failure*, 4(3), 321-330. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12137>
- [17] Nagy, B., Woth, G., Mérei, Á., Nagy, L., Lantos, J., Menyhei, G., Bogár, L., & Mühl, D. (2016). Perioperative time course of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), its tissue inhibitor TIMP-1 & S100B protein in carotid surgery. *Indian Journal of Medical Research*, 143(2), 220-226. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.180212>
- [18] Ikemoto, S., Matsuura, R., Hamano, S. -I., Daida, A., Kubota, J., Hirata, Y., & Koichihara, R. (2018). Elevated Serum MMP-9 and MMP/TIMP-1 Ratio in Patients with Migrainous Infarction and Hemiplegic Migraine. *Journal of Neurology and Neuroscience*, 9(6), Article 278. <https://doi.org/10.21767/2171-6625.1000278>

References

- [1] Rempe, R. G., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2016). Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(9), 1481-1507. <https://doi.org/10.1177/0271678X16655551>