

© Пальцын А.А., 2017
УДК 616-092

Пальцын А.А.

Матриксные протеиназы при инсульте

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8
ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», 123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Матриксные металлопротеиназы — ферментный комплекс, необходимый для сохранения гомеостаза. Он участник нормальной, постоянно текущей реконструкции всех живых тканей. Действие патогенных факторов нарушает слаженную работу этого комплекса. Часто нарушение выражается излишней активностью ферментов, усиливающей патогенное действие. Однако и заживление, форсированное новообразование тканевых элементов, может происходить только при повышенной, в сравнении с нормой, активности металлопротеиназ. Такая ситуация требует от медицины умения разумно вмешиваться в работу ферментной системы. В статье представлены некоторые результаты этих вмешательств.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы; инсульт; гематоэнцефалический барьер; терапия инсульта.

Для цитирования: Пальцын А.А. Матриксные протеиназы при инсульте *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(3): 110—115. DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.110-115

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. Института общей патологии и патофизиологии РАН, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАПО, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.12.2016

Paltsyn A.A.

Matrix metalloproteinases in stroke

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow 125315, Russia
Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

Matrix metalloproteinases — enzyme complex necessary for maintenance of the homeostasis. He is a participant of normal, constantly current reconstruction of all living tissues. Action of pathogenic factors breaks harmonious work of this complex. Often violation is expressed by the excessive activity of enzymes amplifying pathogenic action. However and healing, which is accelerated new growth of tissue elements, can happen only at raised, compared with norm, metalloproteinase activity. Such situation demands from medicine of ability participate reasonably in work of enzyme system. The article presents some of the results of these actions.

Keywords: matrix metalloproteinases; stroke; blood brain barrier; stroke care.

For citation: Paltsyn A.A. Matrix metalloproteinases in stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(3): 110—115. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.03.110-115

For correspondence: Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 11.12.2016

В последние годы появилось много статей [1, 2] о наблюдаемом после инсульта и травмы мозга разрушении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), обусловленном действием матриксных металлопротеиназ (ММП). ММП — семейство (24 фермента у человека) кальций-зависимых, содержащих цинк эндопептидаз, способных расщеп-

лять все компоненты внеклеточного матрикса (ВМ), включая коллаген, ламинин, фибронектин и другие [3]. Есть сообщения и о более широком списке расщепляемых ММП субстратов: молекулы клеточной поверхности, хемокины, цитокины, рецепторы цитокинов, факторы роста и их рецепторы, ферменты [4—7].

Соответственно теме этой статьи нас более всего интересуют структуры ВМ, которые участвуют в образовании ГЭБ. Меньшая (сравнительно с другими капиллярными сетями) проницаемость капиллярной стенки мозга, создающая эффект ГЭБ, обеспечивается слоем эндотелиальных клеток, соединенными между собой плотными контактами. Среди белков плотных контактов различают claudin-1, claudin-5, occludin [8]. Плотные контакты — не единственная особенность эндотелиоцитов мозга — в них снижен трансцитоз (пиноцитоз), повышено содержание митохондрий, существенно отличается набор мембранных рецепторов. С внешней стороны слой эндотелиоцитов окружен базальной мембраной. Базальная мембрана, благодаря заряду и компановке входящих в её состав белков, представляет собой молекулярный фильтр. В базальную мембрану встроены перициты. Так устроены все сосуды тела, но в мозге перициты имеют особенности. Многие структурно-функциональные характеристики ГЭБ зависят от перицитов. Особое положение и значение перицитов, входящих в ГЭБ, иллюстрируется уже их повышенным содержанием. В ЦНС отношение перициты/эндотелиоциты бывает 1/1—1/3, тогда как в других участках тела, например в мышце: 1/10—1/100. Морфологическая особенность, присущая только ГЭБ, заключается в том, что базальная мембрана снаружи охватывается ножками астроцитов. Это анатомическое свойство обеспечивает особо тесное взаимодействие нервной и циркуляторной систем и служит основанием для формулирования понятия о нейроваскулярном комплексе (neurovascular unit) [9]. В связях между перицитами и астроцитами участвуют рецепторы — интегрины. Будучи одним из видов ВМ, базальная мембрана капилляров мозга расщепляется при активации ММП, расщепляются интегрины и белки плотных контактов эндотелиальных клеток [10]. Нарушается плотность контактов между эндотелиоцитами [11].

Наиболее часто описывают при инсульте желатиназу (коллагеназу IV) ММП-9. Она участвует не только в разрушении ГЭБ и развитии отека после инсульта, но и в геморрагических осложнениях, случающихся при терапии ишемического инсульта тканевым активатором плазминогена (tPA) [12].

Очевидно, что эволюция не сохранила бы и не развивала миллионы лет ферментную систему, способную только на усугубление повреждающего действия инсульта, травмы мозга и многих осложнений при действии других этиологических факторов. Конечно, эволюционная успешность комплекса ММП обусловлена их благотворным действием, способностью динамически ремоделировать ВМ и поэтому, быть необходимым элементом процессов роста, развития,

миграции клеток, ангиогенеза, регенерации, заживления ран. Таким образом, интерес к ММП для медико-биологических исследований заключается в том, что зная механизмы работы этой системы и научившись разумно вмешиваться в них, можно ослаблять патогенное действие болезни и усиливать регенераторные способности организма. Область регулирования активности ММП очень привлекательна для исследований как перспектива терапии многих заболеваний. В настоящее время найдены ингибиторы для ММП -1, -2, -3, -7 и -9, однако не известны регуляторы активности ММП -15, -18, -21, и -24 [13].

Активность ММП контролируется на трех стадиях их «производственного цикла»:

- 1) транскрипции;
- 2) активации;
- 3) ингибиции [13].

В организме млекопитающих в норме транскрипция ММП происходит повсеместно, но на низком уровне [14]. Обнаружены конститутивно транскрибируемые ММП-2 и ММП-14 и индуцибельно транскрибируемые ММП-3 и ММП-9 [8]. Их равновесие в гомеостазе поддерживается секрецией в неактивной форме, что защищает внутреннюю среду организма от повреждения ими. Опасная возможность их активации в норме быстро блокируется четырьмя тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (tissue inhibitors metalloproteinases TIMPs) [13, 15]. Индукцию металлопротеиназы-9 можно подавить и искусственно дексаметазоном [16]. Нормальная степень конститутивной активации ММП пространственно ограничена базальной мембраной, обеспечивает её стабильное в отношении толщины состояние. Иными словами, протеиназы блокируют увеличение массы ВМ. Индуцибельные ММП либо не транскрибируются, либо остаются в неактивном состоянии до повышения концентрации активаторов: ионов Ca^{2+} [17], провоспалительных цитокинов, реактивных форм кислорода (reactive oxygen species — ROS), оксида азота, гипоксии [14, 18]. Будучи активированными индуцибельные ММП не ограничивают свое действие местом активации, а вызывают распространенную перестройку или разрушение ВМ. В зависимости от временного параметра активации часто меняется её биологическое значение. Это может быть:

- 1) поддержание гомеостаза в процессах развития;
- 2) повреждение, чаще в начальной стадии болезни;
- 3) регенерация на поздней стадии.

Эти особенности следует учитывать при терапии неврологических расстройств [19]. Продукция ММП-3 и ММП-9 при инсультах может быть индуцирована [20] в нейронах, олигодендроцитах, эндотелиоцитах, астроцитах, микроглиоцитах, макрофагах и нейтрофилах (если они присутствуют в очаге).

Наиболее известные индукторы цитокины TNF- α и IL- β , но, конечно, свою лепту вносят и другие биологически активные молекулы очага. Действие ММП повышает проницаемость ГЭБ, вызывает отек мозговой ткани, эксайтотоксичность, оксидативный стресс, нарушение репаративного синтеза ДНК, не всегда, но часто лейкоцитарную инфильтрацию [21]. Проницаемость ГЭБ и отек мозга часто способствуют появлению кровоизлияний [22]. Важными для современной клинической практики оказались данные о том, что неудачи позднего (после 3 ч от начала болезни) тромболизиса обусловлены тем, что tissue plasminogen activator (tPA) активирует ММП-9 [2, 23]. При достаточной выраженности этих изменений развивается некроз ткани мозга.

Роль ММП в патогенезе очаговых поражений мозга исследовали разными способами. При травме мозга у нокаутных по гену ММП-9 мышей наблюдали меньшую проницаемость ГЭБ, уменьшение размера очагов, большее сохранение двигательной функции и белого вещества сравнительно с дикими мышами [21]. В других экспериментах исследовали роль тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 (ТИМП-1). Он с высокой аффинностью связывает ММП-9 и тем блокирует её действие. У мышей с трансгенно форсированной экспрессией ТИМП-1 сравнительно с дикими мышами после 2 ч фокальной ишемии мозга обнаружили сниженный уровень ММП-9, менее выраженный отек и меньший объем очага через 24 ч [25]. Противоположные результаты были получены у нокаутных по ТИМП-1 мышей: увеличение экспрессии ММП-9, желатинолитической активности, ишемических повреждений, апоптоза нейронов [26].

Лечение тканевыми ингибиторами ММП или нейтрализующими ММП антителами уменьшает повреждение ГЭБ и размер ишемического очага [27].

Оказалось, что примерно одинаково благотворное действие на исход экспериментального инсульта оказывают ингибитор ММП (BB1101) и нормобарическая оксигенация (95% O₂). Снижается содержание ММП-9, уменьшается потеря белка плотных контактов окклюдина, уменьшается объем экстравазатов в ишемизированном полушарии [28].

Развитием этого направления (изучение патогенеза по действию экспериментальной терапии) стала работа [29]. Авторы исследовали комбинированное и изолированное действие двух ингибиторов ММП после 90-минутной окклюзии средней мозговой артерии. Изучали влияние нормобарической оксигенации (95% O₂), снижающей ишемическую индукцию ММП и действие миноциклина (производное тетрациклина), ингибирующего активацию ММП. Применение изолированной оксигенации уменьшало объем

очагов ишемии на 36%. Изолированное применение миноциклина уменьшало объем очагов на 30%. При комбинированном применении ингибиторов объем очагов уменьшался на 68%, снижалась индукция ММП-2/9 и активация каспазы-3 и -9. В большей степени, чем при одиночном ингибировании сохранялся окклюдин. В эксперименте, выполненном по той же схеме, но с применением метиленового синего вместо миноциклина, обнаружено, кроме уменьшения объема очага, более быстрое восстановление функции, нежели при использовании лишь одного из ингибиторов [30].

Сравнительно недавно обнаружено, что так называемые матриксные металлопротеиназы не только матриксные, т.е. осуществляющие протеолиз экстрацеллюлярного белка.

Оказалось, что они могут располагаться в различных интрацеллюлярных зонах, в том числе в ядре [31]. После 2-часовой окклюзии средней мозговой артерии у крыс авторы наблюдали в центральной зоне инсульта совмещение желатиназной активности ядра с маркером зрелых нейронов NeuN. Авторы подают это наблюдение как обусловленную действием желатиназы гибель нейронов. Думаю, такие находки не стоит считать доказательствами гибели нейрональных ядер под действием ММП. В центре очага инсульта много губительных факторов. Однако в дальнейшем эти наблюдения были развиты. В 2010 г. Y. Yang с сотр. из университета штата Нью-Мексико [32] обнаружили после окклюзии средней мозговой артерии и в культуре нейронов, что метка ММП ядер предшествует мечению цитоплазмы и на 20 ч опережает фрагментацию ДНК в ядрах. Ядерные ММП разрушали белки репаративного синтеза ДНК и ускоряли появление апоптоза. Применение ингибитора ММП — BB1101 существенно снижало деструкцию ядер. Увеличение внутриядерной экспрессии ММП находили и в образцах мозга, полученных из клиники. Через 2 года из этого же учреждения вышла работа с целью проверки и уточнения предыдущих результатов на культуре корковых нейронов [33]. В качестве модели ишемии/реперфузии применили кислород-глюкозную депривацию культуры в течение 2 ч. Сразу после реоксигенации увеличивалась внутриядерная активность желатиназы (увеличивался уровень как ММП-2, так и ММП-9 в ядерном экстракте) и оставалась максимальной в течение 24 ч. Внеклеточный уровень желатиназы не изменялся. Статистически значимо снижалась экспрессия двух белков репаративного синтеза ДНК. Обработка нейронов ММП-2/9 ингибитором значительно снижала желатинозную активность, сохраняла ферменты репарации ДНК и жизнеспособность нейронов после кислород-глюкозной депривации.

Группа Yang'a из университета Нью-Мексико провела ориентированные на терапию исследования роли ММП при экспериментальном инсульте [34]. Для большего сходства с болезнью человека работали со спонтанно гипертоническими крысами (фактор риска). Производили 90-минутную окклюзию средней мозговой артерии и исследовали материал на различных сроках после начала реперфузии. После однократного в начале ишемии применения ингибитора ММП — GM6001 наблюдали статистически значимо более благоприятное течение процесса заживления инсульта. Размер некротической зоны через 3—4 нед. был заметно меньше, чем в контроле. Увеличивалось через 3 нед. число новообразованных (NG2 и Ki67 позитивных) сосудов в перинфарктной зоне и экспрессия в них белков плотных контактов. Экспрессия таких белков, а также VEGF обнаруживалась в эндотелиоцитах, перицитах и астроцитах. Описывают это наблюдение как экстраэндотелиальное формирование плотных контактов и участие ММП (синтезированных эндотелиоцитами, перицитами и астроцитами) в восстановлении ГЭБ. Появление NG2⁺ перицитов способствует миграции и морфогенезу эндотелиоцитов при неоваскуляризации. Считают, что кратковременное ингибирование ММП на раннем сроке после инсульта способствует регенерации нейроваскулярного комплекса на позднем сроке. Одно из объяснений нейропротективного действия раннего ингибирования ММП — снижение проницаемости ГЭБ, а следовательно, притока нейротоксичных компонентов крови и, прежде всего нейтрофилов, продуцирующих ММП-9.

Развивая экспериментальную работу по ММП опосредованной терапии инсульта, тот же коллектив опубликовал статью, целью которой было изучение механизма действия уже применяющегося в клинике [35] ингибитора ММП — миноциклина [36]. Инсульт воспроизводили так же, как описано в предыдущей [34] публикации. В начале реперфузии крысы получали одну внутривенную инъекцию миноциклина 3 мг/кг. В контроле вводили растворитель. Через 2—4 нед. в опыте наблюдали (магнитно-резонансная томография) уменьшение зоны инфаркта, увеличение кровотока, меньшую проницаемость ГЭБ, более высокую экспрессию белков плотных контактов. Через 4 нед. обнаружено увеличение содержания ММП-2 и ММП-3, увеличение экспрессии маркера активации микроглии/макрофагов. Микроглиоциты/макрофаги экспрессируют как провоспалительные, так и противовоспалительные факторы. Миноциклин значительно снижал уровень экспрессии провоспалительных (TNF- α и IL-1 β) и увеличивал уровень экспрессии противовоспалительных (TGF- β и IL-10) факторов.

В итоговом обзоре авторы из университета Нью-Мексико [37], имея в виду разрушительную роль внеклеточной и внутриядерной активности ММП, подчеркивают привлекательность терапевтического использования ингибиторов ММП на ранних сроках после инсульта. Они считают, что доклиническое изучение вопроса представило настолько однозначный материал, что можно рекомендовать клинические испытания. В то же время продолжительное (7 и более суток после инсульта) использование ингибиторов ММП может осложнять течение инсульта, уменьшать число сохранившихся нейронов, тормозить ангиогенез. Считают разумным краткосрочное использование в качестве ингибитора миноциклина в остром периоде с заменой его в дальнейшем препаратами, не нарушающими развитие васкуляризации.

Следует отметить, что адресованную клиницистам рекомендацию экспериментаторов из Нью-Мексико не стоит принимать как признак того, что клиника ещё не обращала внимания на ММП. Уже в 2010 г. были опубликованы [38] результаты клинического испытания терапии инсульта миноциклином на 60 больных (средний возраст $65 \pm 13,7$ года). Период полувыведения миноциклина был около 24 ч. Внутривенные инъекции начинали не позднее 6 ч после появления симптомов. Дозы от 3 до 10 мг/кг однократно в сутки в течение 3 дней. Высшую дозу — 10 мг/кг получил 41 больной. У 60% больных лечение миноциклином сочеталось с введениями tPA и такое сочетание не осложнялось кровоизлияниями. Больных наблюдали в течение 90 дней. Миноциклин называют «идеальным» партнером tPA при лечении инсульта.

Есть и другое направление в ММП опосредованной экспериментальной терапии инсульта. Оно основывается на принципе *патологией активируемой терапии* (pathologically activated therapy — PAT) [39]. Создается лекарственный препарат, который связывается с молекулой — мишенью через участок, открывающийся только в патологических условиях, например, при оксидативном стрессе. Нормализация патологии закрывает участок связывания. Вторым вариантом действия PAT препарата: подбор такой скорости ассоциации-диссоциации с мишенью, чтобы блокировались не все мишени, а только их избыток. В 2012 г. появилась статья большого коллектива авторов с описанием результатов PAT экспериментального инсульта [40]. Исследовали препарат SB-3CT, который авторы называют селективным ингибитором ММП. Инсульт создавали закупоркой средней мозговой артерии эмболом аутокрови. SB-3CT вводили внутривенно в дозе 25 мг/кг, в первый день через 2 и 4 ч после эмболии, затем однократно с 1-х по 6-е сут. Оценку результатов производили через 7

сут. Лечение уменьшало объемы инфаркта, и кровоизлияний, улучшало двигательную активность животных (через 1 сут. она была хуже, чем в контроле), снижало уровень ММП-9, увеличивало экспрессию ламинина и белков плотных контактов, обеспечивало большее сохранение ламинин-положительных перicyтов и эндотелиоцитов, уменьшало апоптоз нейронов.

Первостепенное значение расстройств и восстановления циркуляции для исхода инсульта обуславливает перспективность дальнейших исследований, направленных на регулирование ингибированием-активацией ММП патогенеза и саногенеза инсульта. Как отмечалось выше, ингибирование ММП в начале болезни способно уменьшать деструктивные изменения в очаге. В то же время, для развития восстановительных процессов необходима активность ММП. Ангиогенез может начинаться только от уже присутствующих в очаге сосудов и только с помощью ММП. Они необходимы для частичной деградации базальной мембраны «старых» сосудов и перестройки окружающего ВМ, для нарушения связей между эндотелиоцитами, чтобы они и перicyты могли отделяться от «старого» сосуда и смещаться в окружающую ткань, для высвобождения ангиогенных факторов роста и проангиогенных интегринов, связанных с ВМ [41]. Формирующиеся и сформировавшиеся сосуды становятся основой регенерации всего тканевого комплекса мозга: дендритогенеза, синаптогенеза, глиогенеза, нейрогенеза (там, где он возможен — например, в гиппокампе). Сосудистая сеть не только обеспечивает обменные процессы комплекса, но и служит направляющей для миграции нейральной стволовой клетки — прародительницы глиоцитов и нейронов [8].

References

1. Turner R.J., Sharp F.R. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* 2016; 04 March.
2. Abdul-Muneer P.M., Pfister B.J., Haorah J., Chandra N. Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol.* 2015; Nov 5.
3. Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Rudd P.M., Dwek R. A., Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2002; 37: 375-536.
4. Rodríguez D., Morrison C.J., Overall C.M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803: 39-54.
5. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2003; Jul; 200(4): 448-64.

6. Shkorik E.V., Markelova E.V., Silaev A.A., Geltser B.I., Semenikhin A.A., Fedjanina L.N. Matrix metalloproteinases-1, 8, 9 and the risk of cardiovascular complications in patients with CHD before and after myocardial revascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61 (2): 37-45. (in Russian)

7. Akhmedov V.A., Dolgikh V.T., Naumov D.V., Nechiporenko N.A. The participation of matrix metalloproteinase-9 and TIMP-1 in formation of atrial fibrillation paroxysms in patients with metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2013; 57 4: 46-50. (in Russian)

8. Yang Y., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Res.* 2015; Oct 14; 1623: 30-8.

9. Zlokovic B.V. Neurodegeneration and the neurovascular unit. *Nature medicine.* 2010; December; 16(12): 1370-1.

10. Yang Y., Estrada E.Y., Thompson J.F., Liu W., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27: 697-709.

11. Baeten K.M., Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol.* 2011; Nov; 71(11): 1018-39.

12. Lapchak P.A., Chapman D.F., Zivin J.A. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke.* 2000; 31: 3034-40.

13. Mittal R., Patel A.P., Debs L.H., Nguyen D., Patel K., Grati M. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol.* 2016; May 17.

14. Rempe R.G., Hartz A.M., Bauer B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; Jun 20.

15. Hartmann C., El-Gindi J., Lohmann C., Lischper M., Zeni P., Galla H.J. TIMP-3: a novel target for glucocorticoid signaling at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390: 182-6.

16. Nam S.I., Kwon T.K. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in cochlear cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2014; 7: 175-80.

17. Surin A.M., Krasilnikova I.A., Pinelis V.G., Khodorov B.I. Study of the relationship between glutamate-induced delayed calcium deregulation, mitochondrial depolarization and subsequent neuronal death. *Pathogenesis.* 2014; 4: 40-6.

18. Deem T.L., Cook-Mills J.M. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species. *Blood.* 2004; 104: 2385-93.

19. Yang Y., Hill J.W., Rosenberg G.A. Chapter 6 — multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2011; 99: 241-63.

20. Lakhani S.E., Kirchgessner A., Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med.* 2009; Nov 17; 7:97.

21. Chaturvedi M., Kaczmarek L. MMP-9 Inhibition: a Therapeutic Strategy in Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* 2014; 49(1): 563-73.

22. Zhao B.Q., Wang S., Kim H.Y., Storie H., Rosen B.R., Mooney D.J. et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med.* 2006; 12(4): 441-5.

23. Sumii T., Lo E.H. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke*. 2002; 33(3): 831-6.
24. Ramos-Fernandez M., Belloio M.F., Stead L.G. Matrix metalloproteinase-9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2011; 20(1): 47-54.
25. Tejima E., Guo S., Murata Y., Arai K., Lok J., van Leyen K. et al. Neuroprotective effects of overexpressing tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1. *J Neurotrauma*. 2009; 26(11): 1935-41.
26. Fujimoto M., Takagi Y., Aoki T., Hayase M., Marumo T., Gomi M. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(10): 1674-85.
27. Rosenberg G.A., Estrada E.Y., Dencoff J.E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998; 29, 2189-95.
28. Liu W., Hendren J., Qin X.J., Shen J., Liu K.J. Normobarichyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia. *J. Neurochem*. 2009; 108, 811-20.
29. Jin X., Liu J., Liu K.J., Rosenberg G.A., Yang Y., Liu W. Normobarichyperoxia combined with minocycline provides greater neuroprotection than either alone in transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2013; Feb; 240: 9-16.
30. Rodriguez P., Zhao J., Milman B., Tiwari Y.V., Duong T.Q. Methylene blue and normobarichyperoxia combination therapy in experimental ischemic stroke. *Brain Behav*. 2016; May 4; 6(7):e00478.
31. Amantea D., Corasaniti M.T., Mercuri N.B., Bernardi G., Bagetta G. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*. 2008; 152, 8-17.
32. Yang Y., Candelario-Jalil E., Thompson J.F., Cuadrado E., Estrada E.Y., Rosell A. et al. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2010; Jan; 112(1): 134-49.
33. Hill J.W., Poddar R., Thompson J.F., Rosenberg G.A., Yang Y. Intranuclear matrix metalloproteinases promote DNA damage and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation in neurons. *Neuroscience*. 2012; Sep 18; 220: 277-90.
34. Yang Y., Thompson J.F., Taheri S., Salayandia V.M., McAvoy T.A., Jeff W. et al. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013; 33(7): 1104-14.
35. Fagan S.C., Cronin L.E., Hess D.C. Minocycline Development for Acute Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2011; Jun 1; 2(2): 202-8.
36. Yang Y., Salayandia V.M., Thompson J.F., Yang L.Y., Estrada E.Y., Yang Y. Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood-brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *Journal of Neuroinflammation*. 2015; 12: 26.
37. Kimura-Ohba S., Yang Y. Oxidative DNA Damage Mediated by Intranuclear MMP Activity Is Associated with Neuronal Apoptosis in Ischemic Stroke. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016: 6927328.
38. Fagan S.C., Waller J.L., Nichols F.T., Edwards D.J., Pettigrew L.C., Clark W.M. et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke*. 2010; Oct; 41(10): 2283-7.
39. Lipton S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(10): 803-8.
40. Jiankun C., Shanyan Ch., Chunyang Z., Fanjun M., Wei W., Rong H. et al. Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia. *Mol Neurodegener*. 2012; 7: 21.
41. Rundhaug J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2005; Apr-Jun; 9(2): 267-85.