

국소 허혈성 뇌졸중 후 조직 플라즈미노겐 활성제를 투여한 당뇨쥐에서의 미세혈관반응

국립의료원 신경과¹, 연세대학교 의과대학 신경과학교실², 미생물학교실³

이종윤¹ · 김은희² · 권 일² · 유현정³ · 김영대² · 허지회²

Microvascular Response Following Focal Cerebral Ischemia in Diabetic Rats Treated with Tissue Plasminogen Activator

Jong Yun Lee, MD¹, Eun Hee Kim, MS², Il Kwon, MS²,
Hyunjeong Liew, PhD³, Young Dae Kim, MD² and Ji Hoe Heo, MD, PhD²

¹Department of Neurology, National Medical Center, Seoul, Korea

²Departments of Neurology, ³Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Diabetes mellitus (DM) or hyperglycemia is known to be associated with increased risk of intracranial hemorrhage in acute stroke patients who are treated with IV tissue-type plasminogen activator (tPA). However, the underlying mechanism remains unknown. We tested the hypothesis that different expression of matrix metalloproteinase (MMP) and occludin in DM play a role in increased risk of hemorrhages in DM by using a diabetic rat model. **Methods:** DM was induced in Spargue Dawley rats by using injection of streptozotocin (60 mg/kg) and harvesting for 20 weeks. Focal cerebral ischemia was induced by occlusion of the middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 hours and then reperfusion for 18 hours by using a nylon thread. tPA (10 mg/kg) or normal saline was infused via the femoral vein. Spectrophotometry, western blot and zymography were performed to measure the amount of hemorrhages, levels of occludin (tight junction protein) and activity of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, respectively. **Results:** Mortality was significantly higher in diabetic rats. In surviving rats, hemorrhagic amounts and levels of cerebral occludin were not different between diabetic and nondiabetic rats, and tPA-infused and normal saline-infused rats. Although MMP-9 were higher in ischemic groups ($P=0.001$), their activities were not changed in diabetic or tPA-treated rats. **Conclusion:** Occludin and MMP may not play a major role in increasing the risk of hemorrhage in diabetic rats. (Korean J Stroke 2009;11:82-87)

KEY WORDS: Cerebral ischemia · Diabetes mellitus · Tissue plasminogen activator · Hemorrhagic transformation.

서 론

급성 허혈성 뇌졸중 치료에 있어서 tissue-type plasmin-

ogen activator (tPA)는 그 효과가 입증된 대표적 치료법 중 하나이다.^{1,2} 그러나 tPA 사용으로 인한 뇌출혈은 tPA 사용에 제한을 갖게 하는 주요 요소이다. tPA 사용 후 뇌출혈의 발생에 영향을 미치는 요소로는 혈압 상승, 당뇨, 나이, tPA 투여시간 등이 보고되어 있으나 그 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다.³⁻⁵ 따라서 이러한 원인들의 기전에 대한 연구는 tPA 사용의 폭을 넓히고 치료효과를 더욱 크게 할 수 있는 기반을 마련해 줄 수 있다.

뇌졸중 환자의 20~50%에서 증상 발현시 고혈당이 있는 것으로 보고되고 있으며,⁶⁻⁸ 고혈당과 당뇨병 과거력은 tPA

Received: July 31, 2009 / Revised: August 17, 2009

Accepted: August 19, 2009

Address for correspondence: Ji Hoe Heo, MD, PhD

Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine, 250

Seongsan-no, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

Tel: +82-2-2228-1605, Fax: +82-2-393-0705

E-mail: jhheo@yuhs.ac

본 연구는 연세대학교 의과대학 2004년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음 (6-2004-1089).

로 치료한 환자에 있어서 뇌출혈의 예측인자로 보고되고 있다.⁹ 또한, 고혈당은 혈전용해 치료로 폐색부위를 재개통함에도 불구하고, 뇌경색 부위의 크기를 증가시키고 예후를 나쁘게 하는 것으로 보고되고 있다.¹⁰ 이러한 이유로 주요 진료 지침에는 혈당이 400 mg/dL 이상이 되는 경우 정맥내 혈전용해술 시행의 제외대상이 되고 있기도 하다.¹

국소 뇌허혈 후 미세혈관의 손상은 뇌출혈의 기본적인 원인이며,¹¹ 치밀판(basal lamina)을 분해하는 단백분해 효소가 출혈 변환에 관여할 것으로 생각된다.^{12,13} 따라서 당뇨병 환자에서 출혈 변환이 흔한 것은 당뇨병으로 인한 미세혈관의 변화 및 단백 분해효소의 반응이 다르기 때문일 수 있다.

본 연구에서는 급성 허혈성 뇌졸중에서 당뇨병이 있을 때 tPA 사용 후 출혈 변환의 위험이 큰 것은 당뇨병으로 인한 혈뇌장벽(blood brain barrier) 및 미세혈관의 치밀판의 변화가 연관있다는 가설을 당뇨병 모델에서 실험적으로 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

실험동물

8주령의 200~300 g의 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐를 사용하였다. 당뇨병과 대조군으로 나누어 당뇨병에는 60 mg/kg의 streptozotocin을 생리식염수에 녹여 복강내로 투여하였고, 대조군은 생리식염수만 복강내로 투여하였다. 20주간 충분한 양의 고형사료 및 무균음수를 주어 사육하였으며, 당뇨병과 대조군을 각각 3군으로 나누어 실험하였다. 한 군은 대조 실험군(Sham), 또 한 군은 좌측 중대뇌동맥을 폐색시킨 후 tPA를 투여한 군 [middle cerebral artery occlusion (MCAO)+tPA], 나머지 한군은 좌측 중대뇌동맥을 폐색시킨 후 생리식염수를 투여한 군 (MCAO+N/S)이다. 모든 실험동물들은 실험 전까지 몸무게와 식전혈당을 정기적으로 측정하여 당뇨병발현을 확인하였다.

대뇌동맥폐색 및 재관류

실험 쥐는 70%의 N₂O, 30%의 O₂와 아이소플루란(isoflurane)으로 흡입마취를 시킨 상태에서 실험하였다. 체온은 직장체온계를 이용하여 지속적으로 측정하여 섭씨 37 ± 0.5도로 일정하게 유지하였다. 뇌의 허혈은 기존에 보고된 나일론사를 이용한 좌측 중대뇌동맥 폐색과 재관류법을 이용하였다. 즉, 흡입 마취시킨 상태의 실험 쥐의 경부를 정중 절개하여 경동맥을 노출시키고 총경동맥을 결찰한 다음, 내경동맥과 외경동맥의 분지들과 외경동맥을 전기소작 또는 결찰하였다.

다음으로 내경동맥을 일시적으로 혈관 clamp를 이용하여 결찰한 뒤 원위부를 poly-L lysine으로 처리한 4-0 나일론사를 넣어서 내경동맥쪽으로 들어간 것을 확인한 후 혈관 clamp를 풀고 나일론사를 총경동맥 분지부 부터 23 mm까지 밀어 넣어 중대뇌동맥을 폐색하였다. 이러한 과정이 끝난 후 절개된 부분을 봉합하고 나일론사의 끝부분이 피부 바깥쪽으로 나오도록 하였다. 2시간 동안 중대뇌동맥을 폐색한 후 tPA 혹은 생리식염수를 대뇌정맥을 통하여 투여하였다. 투여 후 재관류를 하는데, 재관류는 흡입 마취상태에서 피부 바깥쪽에 남아있는 나일론사를 저항이 느껴질 때까지 잡아 뺀 후 나머지 끝부분을 가위로 절단함으로써 시행하였다. 재관류 전후에 신경학적 평가를 하였다. 18시간 동안 재관류를 한 후, 심장관류를 이용하여 희생시켰다. 대조실험군에서는 나일론사를 내경동맥으로 넣는 것을 제외한 다른 과정은 동일하게 시행하였다.

약물투여

중대뇌동맥 폐색 직후 대뇌정맥에 tPA (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) 혹은 생리식염수를 투여하였다. MCAO+tPA의 경우 tPA를 10 mg/kg의 용량으로 10%는 처음에 일시 주사한 후 나머지를 30분 동안 주입펌프(infusion pump)를 이용하여 투여하였다. tPA의 용량은 섬유소에 대한 특이적 반응성이 인간과 설치류 사이에서 10배의 차이가 난다는 기존의 보고에 의해 결정하였다.¹⁴ MCAO+N/S군의 경우 MCAO+tPA군과 같은 양을 같은 방법으로 투여하였다.

조직처리 및 뇌손상의 평가

재관류 18시간 후 우레탄(urethane)을 복강내로 주사하여 마취한 상태에서 펌프를 이용하여 헤파린이 섞인 차가운 생리식염수를 우심방을 절개한 상태에서 좌심실을 통해 관류함으로써 실험동물을 희생시키고 즉시 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 관상면으로 전두부부터 2 mm 두께로 잘라 7개로 관상 절편화하였다.

뇌출혈 정량분석

뇌출혈의 정량은 spectrophotometric 분석법을 사용하였다.^{15,16} 즉, 뇌조직을 균질화하고, Drabkin's reagent와 혼합하여 헤모그로빈을 cyano methmoglobin으로 변화시킨 후 흡광도를 측정하여 뇌출혈을 정량화하였다. 균질화한 뇌조직의 단백질량을 spectrophotometric 분석법을 이용하여 구한 후 뇌출혈량을 단백질량으로 나누어 비교하였다. 분석시 뇌조직은 양측 반구를 모두 사용하였다.

뇌조직 처리

실험동물의 일부는 심장을 통해 해파린이 포함된 생리식염수로 관류하여 희생시킨 후 뇌를 적출하여 관상면에서 2 mm 간격으로 절편화한 후 섭씨 영하 80도에 냉동상태로 보관하였다가 western blot, zymography와 면역조직화학염색을 위해 사용하였다. 다른 일부는 4% paraformaldehyde를 관류하여 희생시킨 후 면역조직화학염색에 사용하였다.

혈뇌장벽의 변화

혈뇌장벽의 치밀이음부의 주요 구성성분인 occludin을 western blot를 이용하여 당뇨군과 대조군 사이의 변화양상을 비교하였다. 냉동절편조직에서 RIPA buffer (100 mM Tris Cl pH7.5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.5% DOC, 0.1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF)을 이용하여 세포를 추출하였다. 단백질을 Bradford 법을 이용하여 bovine serum albumin을 기준으로 정량하였다. 단백질을 50 µg을 8% SDS-PAGE로 분리하고, polyvinylidene difluoride membrane (PVDF)로 옮긴 후 항체의 비특이적 반응을 막기 위하여 tris buffered saline (TBS) (50 mM Tris Cl pH7.5, 150 mM NaCl)에 5% 탈지분유로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Occludin에 대한 1차 항체 (1 : 100; zymed, San Francisco, CA, USA)로 4°C에서 overnight 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 2차 항체로 1시간 반응시켰다. Tris-buffered saline with Eween-20 (TTBS) (0.5% Tween 20 in TBS)로 5분간 네 번 washing 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)로 반응시켜 X-ray 필름에 노출시켜 감광시켰다. 발현수준의 평가는 densitometry를 이용하여 분석하였다

혈관벽에 작용하는 단백분해효소(Proteinases)의 영향

Matrix metalloproteinases (MMP) 효소의 활성도는 gelatin zymography를 이용하여 측정하였다.¹² 단백질을 추출한 후 0.5% gelatine이 함유된 8% polyacrylamide gel에서 전기영동을 하였다. 이후 배양액에 넣고 배양한 후 0.1% amido black을 이용하여 염색과 탈색을 실시하면 MMP에 의해 분해된 부분은 염색이 되지 않아 정량할 수 있게 된다. MMP 활성도는 스캔 후 Scion Image program의 gel plotting macro로 분석하였다.

통 계

SPSS 12.0을 이용하였다. 각 군의 비교를 위해서 t-test,

Mann-Whitney U test, Kruskal Wallis test 및 chi-square test를 사용하였다. 실험결과값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 각각의 검정에서 P값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 의의가 있는 것으로 하였다.

결 과

당뇨쥐 제작

총 80마리의 웅성 흰쥐에 streptozotocin을 투여하였으며, 이 중 50마리에서 당뇨가 생기는 것을 확인하였다. Streptozotocin 투여 후 다음날부터 체중과 혈당의 의미 있는 차이를 확인하였다 (Figure 1).

실험군과 사망률

각 당뇨군에서는 streptozotocin 투여로 당뇨가 만들어진 개체와, 중대뇌동맥 폐색군에서는 폐색 후 신경학적 장애가 있는 개체만을 최종분석에 사용하였다. 총 91마리의 흰쥐를 대조군과 당뇨군으로 나누어 수술을 시행하였다. 사망률은 대조군에 비해 당뇨군에서 더 높았다 (Table 1, P=0.01). 중대뇌동맥 폐색 및 재관류 후 신경학적 장애가 있었던 흰쥐의 빈도는 대조군에서는 56.7% (17/30), 당뇨군

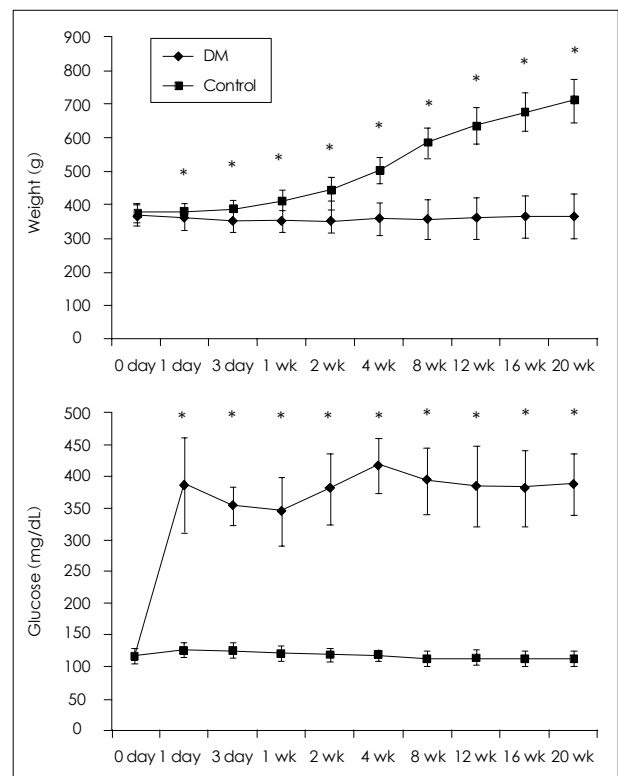


FIGURE 1. Weight and serum glucose levels. Weight and serum glucose levels increased significantly 1 day after administration of streptozotocin. *P<0.05. DM: diabetes mellitus.

TABLE 1. Mortality after induction of middle cerebral artery occlusion and reperfusion in control and diabetic rats

		Total	Death (%)	P value
Control	MCAO+N/S	15	2 (13.3)	0.01*
	MCAO+tPA	26	9 (34.6)	0.798**
DM	MCAO+N/S	18	12 (66.7)	
	MCAO+tPA	22	10 (45.5)	

*Compared with control and DM, **Compared with N/S and tPA. MCAO: middle cerebral artery occlusion, DM: diabetes mellitus, N/S: normal saline, tPA: tissue-type Plasminogen Activator

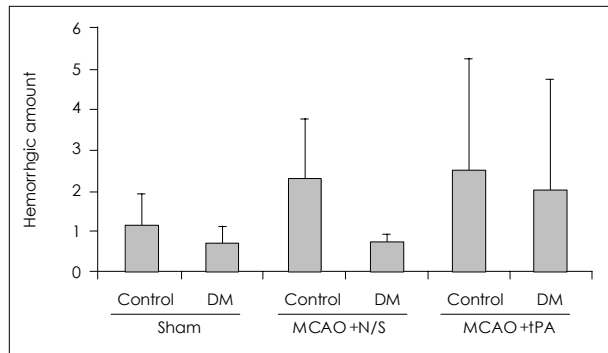


FIGURE 2. Hemorrhagic amounts of the rat brain assessed using spectrophotometry. Hemorrhagic amounts are not significantly different among the groups. DM: diabetes mellitus, MCAO: middle cerebral artery occlusion, N/S: normal saline, tPA: tissue-type Plasminogen Activator.

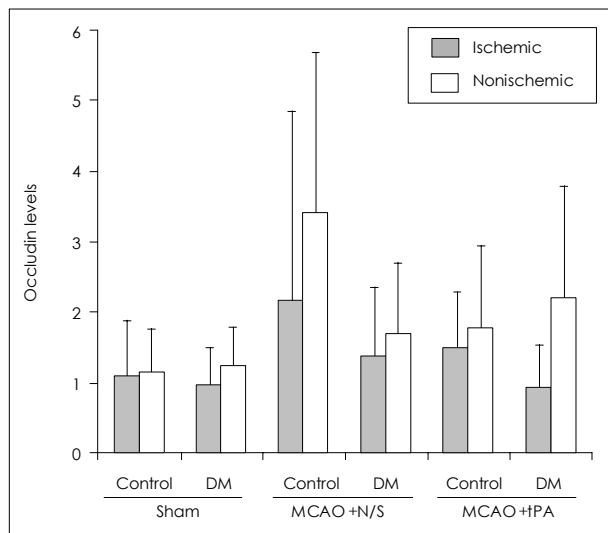


FIGURE 3. Occludin levels of the rat brain. Middle cerebral artery occlusion was performed on the left side. Occludin levels are decreased in the ischemic hemisphere, but they are not different among the groups (DM vs. control and tPA vs. placebo). DM: diabetes mellitus, MCAO: middle cerebral artery occlusion, N/S: normal saline, tPA: tissue-type Plasminogen Activator.

에서는 83.3% (15/18)로 당뇨쥐에서 높았으나 통계적 의미는 없었다 ($P=0.068$). 실험에 사용한 개체 수는 각각 대조군에서 Sham은 5마리, MCAO+N/S은 7마리, MCAO+tPA는 10마리, 당뇨군에서 Sham은 5마리, MCAO+N/S

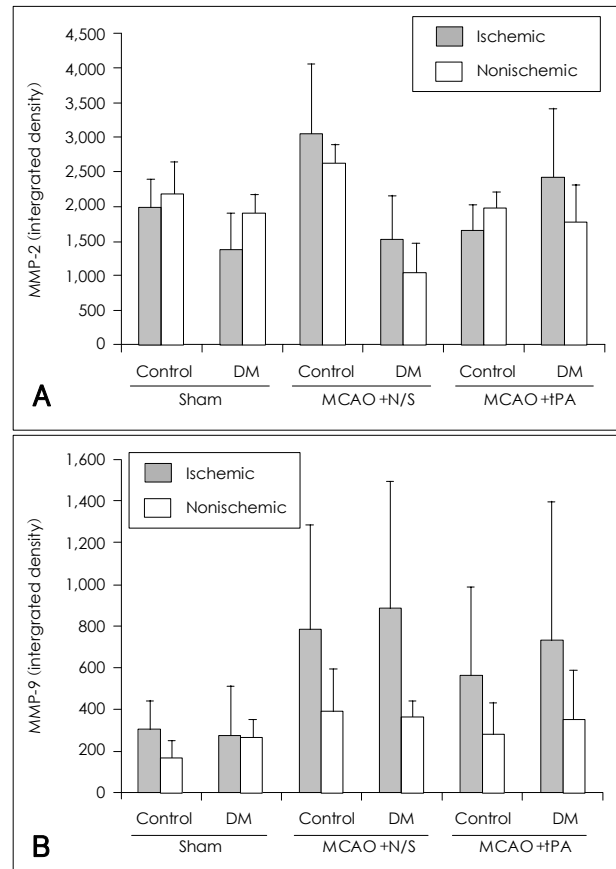


FIGURE 4. Matrix metalloproteinase activity of the rat brain. A: MMP-2. B: MMP-9. MMP-9 levels are higher in the ischemic groups ($P=0.001$). MMP: matrix metalloproteinase, DM: diabetes mellitus, MCAO: middle cerebral artery occlusion, N/S: normal saline, tPA: tissue-type Plasminogen Activator.

은 5마리, MCAO+tPA는 10마리였으며, Sham을 제외한 흰쥐의 신경학적 점수는 차이가 없었다 ($P=0.106$).

뇌출혈량 비교

Spectrophotometry를 이용한 뇌조직에서의 출혈량은 6개 각 군 간에 차이가 없었다 ($P=0.396$) (Figure 2).

Occludin량 비교

Western blot을 이용한 occludin 항원단백질량은 허혈 반구와 비허혈반구간 차이는 있었으나 ($P=0.041$), 각 반구에서 당뇨와 비당뇨군을 포함한 각 군 사이에 차이가 없었다 ($P=0.286, 0.439$) (Figure 3).

단백분해효소들의 양 비교

Gelatin zymography를 이용하여 측정된 MMP-9은 비허혈반구와 비교하여 허혈반구에서 증가하여 있었다 ($P=0.001$). 그러나, 각 군당 비허혈반구와 허혈반구간에 차이

는 없었다 (Figure 4).

고 찰

뇌경색 후 발생하는 뇌출혈은 혈뇌장벽의 파괴와 관련이 있다.¹⁷ 혈뇌장벽은 혈관내피세포사이 치밀 이음부, 기저막 및 혈관주위 별아교 세포의 종단으로 구성된다.¹⁸ 뇌경색에서 혈관내피세포의 파괴 후 기저막이 혈액성분의 혈관 밖으로의 유출을 막아주는 역할을 하는데, 이 기저막의 파괴로 인해 뇌출혈이 발생한다.¹¹ 뇌혈관의 기저막은 4형아교질 (type IV collagen), 라미닌(laminins), 섬유결합소 및 헤파란설페이트(heparan sulfate) 등으로 구성되어 있다. 기저막은 플라스민(plasmin), MMP와 백혈구파립효소의 분비에 의해 분해된다. 기저막의 파괴에는 단백분해효소가 중요한 역할을 하는데, MMP-2와 MMP-9가 4형 아교질과 라미닌을 분해하여 기저막 파괴에 핵심역할을 한다.¹⁹ 이 중 MMP-9가 뇌출혈에 중요한 역할을 하는데 원숭이를 이용한 뇌경색 모델에서 뇌경색 후의 출혈성 전환과 MMP-9의 연관성이 처음 보고되었다.¹² 또한, 토끼나 쥐와 같은 동물을 이용한 뇌경색 모델에서 MMP-9 억제제를 tPA와 함께 사용시 뇌경색 후의 뇌출혈이 방지됨이 관찰되어 그 연관성이 입증되었다.^{20,21} 그리고 실제 심인성 뇌경색 환자 및 혈전용해 치료 전 혈중 MMP-9의 증가가 뇌출혈의 발생과 연관되어 있음이 보고되기도 하였다.^{22,23} tPA는 그 자체가 기저막을 파괴하는 효과가 있지만, MMP의 작용을 증강시켜 혈뇌장벽의 파괴에 영향을 주어 뇌출혈 발생에 더욱 기여한다.²¹

고혈당과 당뇨병 과거력은 rtPA로 치료한 환자에 있어서 뇌출혈의 예측인자로 알려져 있다.⁹ 당뇨쥐 모델에서 뇌조직의 MMP와 같은 단백분해효소에 대한 연구는 아직 없으나, 망막조직이나 대동맥조직에서는 MMP-9의 발현이 증가되어 있었다.^{24,25} 따라서 본 연구에서는 당뇨쥐에서 뇌출혈이 더 많이 발생하며, 당뇨쥐의 뇌조직에서 혈뇌장벽이 비당뇨쥐와 차이가 있을 가능성, 또는 뇌허혈시 당뇨쥐에서의 MMP-9 발현이 비당뇨쥐와 다를 것이라는 가설을 세우고 이를 증명하고자 하였다. 본 연구에서 비허혈반구와 비교하였을 때 허혈반구에서 MMP-9은 증가되어 있었고, 혈뇌장벽의 치밀이음부의 구성당백인 occludin은 감소하여 있었다.

그러나 본 연구에서 당뇨쥐와 비당뇨쥐 사이에 뇌조직 내 헤모글로빈의 양에 차이가 없었다. 혈뇌장벽의 차이에 대한 지표로 조사한 occludin의 양도 차이가 없었다. 또한 MMP의 발현도 당뇨쥐와 비당뇨쥐 사이에 차이가 없었다.

그리고 tPA 투여 또한 조직내 헤모글로빈, occludin 및 MMP의 변화에 영향을 미치지 않았다.

이러한 결과에 대해 여러 가지로 해석이 가능할 수 있다. 첫 번째로 당뇨쥐에서 뇌허혈 유도 후 사망이 높았다. 실험분석에서 사망한 쥐는 사용하지 못하고 생존한 쥐만 사용할 수밖에 없었는데, 실제 본 실험에서 가정했던 혈뇌장벽 및 MMP의 변화가 있었던 쥐들은 뇌출혈로 사망함으로써, 실험분석군 선택의 오류가 발생했을 가능성이 있다. 당뇨쥐에서 뇌허혈 유도 후 사망률이 높았던 점을 보면, 실제 이들에게서 뇌경색이 더욱 심하였거나 뇌출혈이 발생하였을 가능성이 있다. 둘째로 생존한 쥐에서 뇌출혈의 빈도가 높지 않았다는 것으로 볼 때 뇌출혈과 관계된 occludin 및 MMP의 변화도 없었을 가능성이 있다. 뇌경색 후 또는 tPA 사용 후 뇌출혈이 흔한 합병증은 아니기 때문에, 본 실험에서 사용된 개체수가 이를 증명하기에는 부족하였을 가능성이 있다. 세 번째로, 당뇨병 환자에서 혈전용해제 투여시 뇌출혈의 빈도가 증가하는 것이 본 실험에서 가정했던, 혈뇌장벽의 occludin 또는 MMP와는 무관할 가능성이 있다. 만일 이러한 분자적 기전이 관여한다면, 뇌출혈이 발생하지 않더라도 뇌허혈 유도시 이들의 발현이 당뇨쥐와는 차이가 있을 가능성도 있는데, 본 실험에서는 그렇지 않았다는 점에서 occludin이나 MMP와는 다른 기전을 통해 뇌출혈의 위험이 증가할 가능성이 있다. 이 점에 대해서는 좀 더 연구가 필요한 부분이다. 네 번째로 종의 차이에 의한 것일 수도 있다. 그러나 인간에서와는 달리 아직 당뇨쥐에서 뇌출혈이 증가한다는 보고는 없음에도 불구하고, 당뇨쥐나 고혈당이 있는 경우 뇌경색이 더 심하다는 것은 환자뿐 아니라 쥐를 이용한 실험모델에서도 증명된 바 있어²⁶ 종간 차이에 의한 가능성은 적을 것으로 생각된다. 마지막으로 사용된 쥐들은 8주령의 쥐를 20주간 사육하였는데, 이는 기존의 보고에서 streptozotocin 투여 16~20주 후 중뇌동맥의 평활근층의 비가역적 비후를 보였으며, 이러한 비후가 당뇨에서 뇌경색 발생의 한 요소가 될 수 있기 때문이었다.²⁷ 따라서 이러한 변화 및 고령의 요소가 영향을 미쳤을 가능성도 있다.

본 실험에서는 당뇨병 환자에서 혈전용해 치료시 뇌출혈의 위험이 더 크다고 알려져 있는 현상에 대해 실험적으로 증명하고자 하였고, 기존에 알려져 있는 몇 가지 뇌출혈 기전과의 연관성을 밝히고자 하였으나, 그 연관성을 증명하지는 못하였다. 실제 본 연구에서 증명하고자 한 기전이 관계가 없을 가능성이 있지만, 위에서 언급한 실험방법 상의 제한점이 있었기 때문에 확실한 결론을 내리는 데는 한계가 있었다. 그렇지만 최근 뇌졸중 환자에서 당뇨가 있는

경우 뇌출혈의 위험때문에 혈전용해제 치료기준에서 제외하는 임상가이드라인이 제시되는 점을 고려할 때,¹ 이 분야 및 기전에 대한 연구가 거의 없는 것은 아쉬운 점이다. 이런 관점에서 당뇨와 혈전용해제 투여 후 뇌출혈의 기전을 조사하기 위해서 시도한 본 연구가 이 분야에 대한 실험적 연구의 중요한 시작이 될 것을 기대해본다.

중심 단어: 뇌경색 · 당뇨 · 조직 플라즈미노겐 활성화제 · 출혈 변환.

REFERENCES

1. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1581-1587.
2. Lee KY, Kim DI, Kim SH, Lee SI, Chung HW, Shim YW, Kim SM, Heo JH. Sequential combination of intravenous recombinant tissue plasminogen activator and intra-arterial urokinase in acute ischemic stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004;25:1470-1475.
3. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH, Hennerici M, the ECASS Study Group. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995;274:1017-1025.
4. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 1997;28:2109-2118.
5. Larrue V, von Kummer R, del Zoppo G, Bluhmki E. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 1997;28:957-960.
6. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 2001;32:2426-2432.
7. Bruno A, Biller J, Adams HP Jr, Clarke WR, Woolson RF, Williams LS, Hansen MD. Acute blood glucose level and outcome from ischemic stroke. Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Investigators. *Neurology* 1999;52:280-284.
8. Kent TA, Soukup VM, Fabian RH. Heterogeneity affecting outcome from acute stroke therapy: making reperfusion worse. *Stroke* 2001;32:2318-2327.
9. Demchuk AM, Morgenstern LB, Krieger DW, Linda Chi T, Hu W, Wein TH, Hardy RJ, Grotta JC, Buchan AM. Serum glucose level and diabetes predict tissue plasminogen activator-related intracerebral hemorrhage in acute ischemic stroke. *Stroke* 1999;30:34-39.
10. Els T, Klisch J, Orszagh M, Hetzel A, Schulte-Mönting J, Schumacher M, Lücking CH. Hyperglycemia in patients with focal cerebral ischemia after intravenous thrombolysis: influence on clinical outcome and infarct size. *Cerebrovasc Dis* 2002;13:89-94.
11. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1373-1378.
12. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-633.
13. Heo JH, Kim SH, Lee KY, Kim EH, Chu CK, Nam JM. Increase in plasma matrix metalloproteinase-9 in acute stroke patients with thrombolysis failure. *Stroke* 2003;34:e48-e50.
14. Korminger C, Collen D. Studies on the specific fibrinolytic effect of human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator in human blood and in various animal species in vitro. *Thromb Haemost* 1981;46:561-565.
15. Choudhri TF, Hoh BL, Solomon RA, Connolly ES Jr, Pinsky DJ. Use of a spectrophotometric hemoglobin assay to objectively quantify intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 1997;28:2296-2302.
16. Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:452-457.
17. Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 2004;56:468-477.
18. del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:1-9.
19. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:360-366.
20. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-3040.
21. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002;33:831-836.
22. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 2001;32:2762-2767.
23. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003;107:598-603.
24. Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, Tanaka Y, Imai M, Tsukahara S. Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina* 2001;21:28-33.
25. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 2001;88:1291-1298.
26. Nedergaard M. Transient focal ischemia in hyperglycemic rats is associated with increased cerebral infarction. *Brain Res* 1987;408:79-85.
27. Cellek S, Anderson PN, Foxwell NA. Nitroergic neurodegeneration in cerebral arteries of streptozotocin-induced diabetic rats: a new insight into diabetic stroke. *Diabetes* 2005;54:212-219.