



Peran Polimorfisme GeN MMP-9-1562C/T Terhadap Kejadian Retinopati Diabetik Pada Pasien DM

Ekawaty Suryani Mastari

Universitas Imelda Medan

Corresponding Author : ✉ ekawaty49@gmail.com

ABSTRACT

Retinopati diabetik merupakan komplikasi neurovaskular pada diabetes yang melibatkan kerusakan sawar-darah retina. Peran matriks metalloproteinase dalam mendegradasi matriks ekstrasel memperantarai kerusakan sel endotel retina dan proliferasi vaskular. Matriks metalloproteinase-9 (MMP-9) telah diketahui berperan pada inflamasi dan neovaskularisasi retina. Oleh karenanya, polimorfisme MMP-9 -1562C/T dianggap berperan pada risiko terjadinya retinopati diabetik. Penelitian ini merupakan studi *cross-sectional* dengan 52 pasien retinopati diabetik dan 42 pasien DM tanpa komplikasi sebagai kontrol. Pemeriksaan polimorfisme gen MMP-9 -1562C/T dilakukan dengan teknik PCR-RFLP. Perbedaan frekuensi proporsi genotip dan alel kedua kelompok dianalisis dengan uji *chi square*. Diperoleh frekuensi genotip CC 75%, CT 23,1%, dan TT 1,9% pada kelompok kasus serta genotip CC 54,8%, CT 45,2% dan tidak dijumpai genotip TT pada kelompok kontrol. Uji keseimbangan Hardy-Weinberg pada frekuensi genotip menunjukkan kesesuaian ($p>0,05$). Uji proporsi frekuensi genotip dan alel pada kelompok kontrol dan kelompok kasus menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna ($p>0,05$). Polimorfisme gen MMP-9 -1562C/T bukan merupakan faktor risiko utama terjadinya retinopati diabetik pada pasien DM

Kata Kunci

Retinopati Diabetik, Polimorfisme, Gen MMP-9

PENDAHULUAN

Retinopati diabetik merupakan komplikasi mikrovaskular yang sering dijumpai pada pasien diabetes. Terdapat berbagai mekanisme molekul kompleks yang terlibat dalam perkembangan retinopati diabetik (Kowluru *et al.*, 2011). Terjadinya retinopati diabetik berbanding lurus dengan lamanya diabetes, yakni sekitar 50% pada pasien yang menderita diabetes selama 10 tahun dan meningkat menjadi 90% setelah 20-25 tahun (Tewari, Santos and Kowluru, 2012).

Diabetes merupakan merupakan penyakit dengan beban sosioekonomi tertinggi secara global dan regional. Jumlah penderita diabetes usia 18 sampai 99 tahun di seluruh dunia pada 2017 adalah sekitar 451 juta, dan diperkirakan akan meningkat menjadi 693 juta pada 2045. Angka prevalensi pada kelompok umur ini meningkat sesuai pertambahan usia (Cho *et al.*, 2018). Hasil Riskesdas 2018 menunjukkan prevalensi DM semua umur di Indonesia sebesar 1,5% pada semua

kelompok umur dan 2% pada usia ≥ 15 tahun (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014).

Retinopati diabetik diperkirakan terjadi pada sepertiga jumlah penderita diabetes. Yau et al (2012) menyatakan bahwa prevalensi retinopati diabetik 35,4% dan *Proliferative Diabetic Retinopathy* (PDR) sebesar 7,5%. Secara umum, tingkat prevalensi di negara-negara Barat lebih tinggi dibandingkan di Asia. Di Asia, prevalensi tertinggi adalah di Singapura yakni sebesar 33,9% (Lee, Wong and Sabanayagam, 2015). Berdasarkan ras, prevalensi retinopati diabetik tertinggi adalah pada ras Kaukasoid (46,7%), ras Mongoloid (26,9%) dan pada ras Asia-kombinasi (20,87%) (Yau et al., 2012).

Di Indonesia, penelitian pada penderita DM di Yogyakarta menyatakan bahwa prevalensi retinopati diabetik sebesar 43,1% dengan retinopati diabetik proliferasi sebesar 12,1% (Sasongko et al., 2017). Sementara itu, di RSUD Sanglah dijumpai prevalensi retinopati diabetik sebesar 6,92% dari seluruh penderita DM tipe 2 (Krishnan and Subawa, 2017). Di Sumatera Utara, penelitian yang dilakukan Fitriani pada Juli 2011-Juni 2012 menunjukkan bahwa retinopati diabetik merupakan penyebab 1% jumlah kunjungan ke Poliklinik Mata RSUP H. Adam Malik.

Akibat potensial retinopati diabetik sebagai penyebab gangguan penglihatan dan kebutaan di seluruh dunia ditunjukkan oleh tingginya angka prevalensinya pada penderita DM. Penelitian metaanalisis oleh Yau menunjukkan 10% dari penderita DM dengan retinopati diabetik berada pada stadium mengancam kebutaan. Patomekanisme retinopati diabetik pada DM terjadi lambat dan *silent* sehingga cenderung terdeteksi pada kondisi yang berat (Yau et al., 2012).

Terjadinya retinopati diabetik dimulai saat hiperglikemia konstan terjadi, yakni pada 2-6 minggu setelah terjadinya diabetes. Pada tahap awal, perjalanan penyakit berlangsung *silent* dan sebagian besar kasus terdeteksi ketika penyakit sudah memasuki stadium lanjut. Mekanisme yang terjadi melibatkan berbagai jalur biomolekul, sitokin dan enzim yang dipengaruhi oleh faktor genetik (Kowluru et al., 2011). Selain itu, retinopati diabetik juga dipengaruhi berbagai faktor risiko yakni usia, lama menderita diabetes, jenis diabetes, kontrol glukosa darah, hipertensi, obesitas, dislipidemia dan ada tidaknya komplikasi diabetes lainnya (Jenkins et al., 2015). Patobiologi retinopati menunjukkan peranan stress oksidatif, MMP (Matriks Metalloproteinase), protein kinase C (PKC) dan jalur polyol (Kowluru, 2010).

MMP merupakan endopeptidase bergantung zinc yang berperan pada berbagai proses biomolekul tubuh yakni dalam proliferasi, migrasi, differensiasi dan apoptosis sel dikarenakan kemampuannya mengatur struktur dan

komposisi matriks ekstraselular dan sistem sinyal di permukaan sel. MMP berperan penting dalam penyembuhan jaringan, perkembangan jaringan dan organ (Djuric and Zivkovic, 2017).

MMP-9 merupakan satu dari 23 jenis MMP di dalam tubuh manusia dan termasuk golongan gelatinase. Enzim ini terdapat di sel endotel, sel epitel, astrosit, mikroglia, neutrofil, makrofag, sel Schwann, sel otot polos dan sel myofibroblast (Vandooren, Van Den Steen and Opdenakker, 2013). MMP-9 disekresikan dalam bentuk laten dan teraktivasi bergantung substrat serta dapat bekerja di matriks ekstrasel, intrasel dan di dalam organel sel (Tewari, Santos and Kowluru, 2012; Vandooren, Van Den Steen and Opdenakker, 2013). Ekspresi gen *MMP-9* dipengaruhi oleh berbagai sitokin, protease, interaksi sel dan hormon. MMP-9 tidak hanya bekerja di matriks ekstrasel tetapi juga di sitosol serta dapat mengganggu fungsi dan merusak membran mitokondria (Jobin, Butler and Overall, 2017). Sebaliknya, stress oksidatif yang dihasilkan mitokondria juga dapat menginduksi MMP-9 (Kowluru *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2019).

Hubungan MMP-9 terhadap terjadinya retinopati diabetik terkait dengan peran MMP-9 dalam proses inflamasi, angiogenesis dan anti-angiogenesis, disfungsi mitokondria serta apoptosis sel (Kowluru *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015). Penelitian Yong *et al* (2008) dan Yu *et al* (2016) pada retina tikus diabetik menunjukkan peningkatan ekspresi gen *MMP-9* berhubungan dengan peningkatan permeabilitas vaskular retina. Kerusakan sawar darah retina akibat inflamasi merupakan proses penting pada terjadinya diabetik retinopati (Rübsam, Parikh and Fort, 2018). Pada keadaan hiperglikemik yang konstan, MMP-9 menyebabkan kerusakan sawar darah-retina melalui induksi VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dan degradasi occludin (Giebel *et al.*, 2005; Opdenakker and Abu El-Asrar, 2019).

Peningkatan AGEs (*Advanced Glycosilated End-products*) pada diabetes menyebabkan banyaknya neutrofil, sel dendritik dan makrofag di berbagai jaringan tubuh termasuk retina (Manigrasso *et al.*, 2014). Pada tahap inflamasi akut MMP-9 dihasilkan oleh neutrofil, sementara pada keadaan kronis MMP-9 yang ada di retina berasal dari makrofag atau mikroglia (Opdenakker and Abu El-Asrar, 2019).

Retinopati diabetik melibatkan berbagai sel di jaringan retina yaitu sel endotel dan perisit, sel neuron retina, sel Muller, astrosit, mikroglia, sel imun dan sel epitel berpigmen retina (Duh, Sun and Stitt, 2017). Penurunan viabilitas sel dan terjadinya apoptosis mitokondria sel Muller retina berhubungan dengan peningkatan ekspresi gen *MMP-9* pada diabetik retinopati (Chen *et al.*, 2015). Apoptosis sel Muller retina terjadi akibat aktivasi protein H-Ras dan menurunnya Sirt1 pada kondisi hiperglikemik konstan yang juga menginduksi

MMP-9. Peningkatan MMP-9 secara langsung dapat mendegradasi membran mitokondria dan dapat mendorong ekspresi berbagai protein apoptotik seperti Bcl2 dan caspase3 (Kowluru *et al.*, 2011; Kowluru, Santos and Zhong, 2014).

Gen *MMP-9* terdapat di kromosom 20(20q13.12). *MMP-9* diregulasi pada beberapa titik yakni pada transkripsi gen, translasi m-RNA, dan sekresinya (Vandooren, Van Den Steen and Opdenakker, 2013). Pada level transkripsi, sekuen upstreamnya merupakan tempat berikatan faktor transkripsi seperti NF- κ B, AP-1 dan SP-1 serta berbagai aktivator yakni p300 dan CREB (Zhao and Benveniste, 2008).

Beberapa penelitian melaporkan adanya variasi *MMP-9* yang berhubungan dengan berbagai penyakit, yakni di -1562C/T, R279Q dan R668Q, di antaranya yang paling banyak diteliti adalah polimorfisme di promotor gen *MMP-9* -1562C/T (*rs3918242*) yang dikaitkan dengan sindrom metabolik, obesitas, nefropati diabetik, glaukoma, lupus nefritis, dan penyakit jantung koroner (Feng *et al.*, 2016; Djuric and Zivkovic, 2017; Thakur *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Gen *MMP-9* -1562C/T terletak di *upstream* dan merupakan tempat berikatan protein repressor transkripsi. Pada polimorfisme ini, codon C mengalami *missense* menjadi T, sehingga terjadi penurunan perlekatan protein repressor dan up-regulasi *MMP-9* (Thakur *et al.*, 2018).

Terdapat penelitian mengenai hubungan polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T dengan makroangiopati dan komplikasi diabetes lainnya yakni ulkus diabetikum (Singh *et al.*, 2013) dan nefropati diabetik. Selain itu, polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T juga dihubungkan dengan peningkatan kadar *MMP-9* dan kejadian PDR pada populasi India (Singh *et al.*, 2017). Akan tetapi belum ada penelitian mengenai hubungan polimorfisme gen ini dengan retinopati diabetik di Indonesia. Oleh karenanya, peneliti tertarik untuk meneliti polimorfisme gen *MMP-9* -1562 C/T dengan retinopati diabetik pada penderita DM.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian *case control* untuk mengetahui hubungan faktor risiko dengan kejadian penyakit dengan membandingkan kelompok kasus (penderita retinopati diabetik) dan kelompok kontrol. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara pada Maret-April 2020.

Pemeriksaan Retinopati Diabetik

Penegakan diagnosis retinopati diabetik pada penelitian ini dilakukan oleh dokter spesialis mata. Pemeriksaan ini terdiri atas pemeriksaan segmen anterior bola mata dengan *slitlamp* dan pemeriksaan segmen posterior bola mata dengan

menggunakan oftalmoskop tidak langsung. Berikut merupakan langkah pemeriksaan oftalmoskopi tidak langsung (Emptage *et al.*, 2014):

- Dilatasi pupil pasien dengan meneteskan 1% tropicamide dan 2,5% phenylephrine
- Pasien diminta berbaring setengah duduk atau terlentang
- Dengan menggunakan oftalmoskop, dokter mengevaluasi segmen posterior bola mata sambil meminta pasien menggerakkan mata ke berbagai arah.

Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisa secara deksriptif dan disajikan dalam tabel distribusi frekuensi. Pengolahan data dilanjutkan dengan menggunakan uji Mann Whitney untuk data numerik dan *Chi Square* untuk menguji proporsi perbedaan parameter dua kelompok kategorik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Subjek Penelitian

Penelitian epidemiologi sebelumnya mengenai retinopati diabetik menunjukkan berbagai nilai rerata usia penderita retinopati diabetik. Rerata usia penderita retinopati diabetik di China yaitu $61,15 \pm 9,18$ tahun dan di Singapore yaitu $62,5 \pm 9,4$ tahun (Wong *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2020). Di Indonesia, rerata usia penderita retinopati diabetik dijumpai lebih rendah yakni di Yogyakarta $58,4 \pm 9,3$ tahun sementara di RSUD Sanglah Denpasar dan di RS Haji Adam Malik berusia 50-59 tahun (Fitriani and Sihotang, 2017; Krishnan and Subawa, 2017; Sasongko *et al.*, 2017). Rerata usia penderita retinopati diabetik di tiga penelitian tersebut sesuai dengan penelitian ini yaitu $57,12 \pm 10,49$ tahun.

Nilai rerata usia kelompok kontrol pada penelitian ini adalah $60,24 \pm 10,32$ tahun. Hal ini sesuai dengan data prevalensi tertinggi usia penderita DM di Indonesia yaitu 55-64 tahun dan 65-74 tahun (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2019).

Pada kedua kelompok penelitian yaitu kelompok kontrol dan kelompok retinopati diabetik tidak dijumpai perbedaan bermakna rerata usia ($p > 0,05$). Hal ini juga dijumpai pada penelitian oleh Xu (2014) dan Sasongko (2017) (Xu *et al.*, 2014; Sasongko *et al.*, 2017).

Berdasarkan jenis kelaminnya, pada kelompok kasus penelitian ini dijumpai lebih banyak perempuan yaitu 31 orang (59,6%). Hal ini juga dinyatakan dalam penelitian di Yogyakarta dimana penderita perempuan 69% ($p > 0,05$) (Sasongko *et al.*, 2017). Penelitian di Singapore (2008) dan China (2014) juga menunjukkan proporsi wanita lebih tinggi dibandingkan pria baik pada PDR (7% vs 2 %), NPDR berat (3% vs 0,2%) dan NPDR sedang (12% vs 4%)

sementara di China subjek perempuan pada kelompok retinopati adalah 58% (Wong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014).

Jenis kelamin terbanyak pada kelompok kontrol adalah laki-laki (57,1%). Hal ini berbeda dengan Infodatin 2018 dimana penderita DM di Indonesia lebih banyak adalah perempuan (60%) (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2019). Penelitian di RSUP H. Adam Malik Medan pada 2019 juga menunjukkan lebih banyak perempuan (53,3%) (Amelia and Harahap, 2019).

Pada penelitian ini tidak dijumpai perbedaan bermakna jenis kelamin kelompok kasus dan kontrol. Hal ini juga sesuai dengan penelitian di Singapore (2008) dan China (2014) dimana perbedaan jenis kelamin dianggap tidak memiliki hubungan bermakna dengan kejadian retinopati diabetik (Wong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014).

Lama menderita diabetes menjadi salah satu faktor risiko terjadinya retinopati diabetik, dimana risiko retinopati diabetik meningkat 25% bila pasien menderita diabetes > 5 tahun ((Flaxel *et al.*, 2020). Penelitian di China, Singapore, India dan Yogyakarta menunjukkan bahwa kelompok penderita retinopati diabetik memiliki riwayat menderita diabetes lebih lama dibandingkan dengan kelompok kontrol DM tanpa retinopati (Wong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014; Sasongko *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017). Pada penelitian ini juga dijumpai perbedaan signifikan lama menderita diabetes antara kelompok kasus retinopati dan kelompok kontrol.

Perbandingan rerata kadar HbA1C antara kelompok retinopati dan kelompok kontrol menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$). Akan tetapi, dapat dilihat bahwa kelompok kasus memiliki nilai HbA1C yang lebih tinggi yaitu $8,92 \pm 2$ mg/dl dibandingkan kelompok kontrol yaitu $8,59 \pm 2,28$ mg/dl. Hal ini juga dijumpai pada penelitian di China dimana kelompok retinopati memiliki nilai HbA1C lebih tinggi yaitu $8,92 \pm 1,33$ mg/dl dibandingkan kontrol $8,15 \pm 1,23$ mg/dl (Yin *et al.*, 2020). Penelitian di Singapore dan India juga menunjukkan bahwa nilai HbA1C pada penderita retinopati diabetik lebih tinggi dibandingkan DM non-retinopati (Wong *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2017).

Analisis Distribusi Frekuensi Genotip dan Alel Polimorfisme Gen MMP-9 -1562C/T

Pada penelitian ini diperoleh distribusi genotip gen MMP-9 -1562C/T yaitu 62 orang (66%) genotip CC, 31 orang genotip CT (33%) dan 1 orang (1,1%) genotip TT. Pada penelitian lain polimorfisme gen MMP-9 -1562C/T di berbagai negara dijumpai perbedaan distribusi genotip.

Penelitian oleh Singh pada retinopati diabetik di India menunjukkan frekuensi genotip CT yang lebih tinggi (57,5%) dibandingkan genotip CC (38,4%)

dan *TT* (4,1%). Pada tabel 5.1 ditampilkan distribusi genotip dari penelitian polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T pada retinopati diabetik, diabetik nefropati, obesitas, dan glaukoma. Pada penelitian lainnya pada tabel tersebut dapat dilihat bahwa genotip *CC* lebih tinggi yaitu 54-73% dan genotip *TT* yang paling rendah yaitu 0,89-17,9%, sedangkan genotip *CT* berkisar 22-42,7%. Selain pada kelompok kasus, frekuensi genotip *CC* juga paling banyak dijumpai pada kelompok kontrol.

Tabel 1.

Perbandingan Distribusi Genotip Kelompok Kasus dan Kontrol Berbagai Penelitian Polimorfisme Gen *MMP-9* -1562C/T

Negara	N		Genotip Kelompok Kontrol (%)			Genotip Kelompok Kasus (%)			<i>p</i>	Referensi
	Kontr ol	Kasu s	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>		
Ceko	186	128	72	26	3	73	25	2	>0,05	(Beránek <i>et al.</i> , 2008)
India	73	325	73,6	25,5	0,9	38,4	57,5	4,1	0,001	(Singh <i>et al.</i> , 2017)
India	267	110	73,4	25,84	0,75	54,6	42,7	2,7	0,0036	(Singh <i>et al.</i> , 2013)
India	190	180	68,9	28,5	2,6	55	37,2	7,8	0,028	(Yadav <i>et al.</i> , 2014)
India	367	224	69,75	28,61	1,63	61,16	37,9	0,89	0,052	(Thakur <i>et al.</i> , 2018)
China	100	160	45	13	42	60,1	22	17,9	<0,05	(Feng <i>et al.</i> , 2016)
Penelitian ini	42	52	54,8	45,2	0	75	23,1	1,9	0,058	

Pada penelitian ini, tidak dijumpai perbedaan bermakna frekuensi genotip antara kelompok kasus dan kelompok kontrol ($p>0,05$). Selain itu, pada proporsi alel kedua kelompok juga tidak dijumpai perbedaan bermakna ($p<0,01$). Hal ini dijumpai pula pada penelitian polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T di Ceko dimana tidak dijumpai perbedaan bermakna genotip kelompok retinopati dan kelompok kontrol non-DM (Beránek *et al.*, 2008). Sementara pada populasi India yang diteliti oleh Singh *et al* (2017) dijumpai alel T berperan dengan kejadian PDR dibandingkan dengan kelompok DM. Pada penelitian yang sama alel T juga

dianggap berperan dengan kejadian NPDR dibandingkan kelompok DM. (Singh *et al.*, 2017).

Analisis Peran Polimorfisme Gen *MMP-9* -1562C/T terhadap Kejadian Retinopati Diabetik

Polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T telah banyak dihubungkan dengan komplikasi diabetes diantaranya retinopati, nefropati dan ulkus diabetikum. Penelitian Singh (2017) menunjukkan alel T pada polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T berhubungan signifikan dengan risiko PDR pada pasien DM (OR=2,84; $p<0,001$). Penelitian yang sama juga menunjukkan hubungan risiko PDR pada pasien dengan NPDR (OR=1,92; $p=0,009$) (Singh *et al.*, 2017).

Peningkatan kadar *MMP-9* dapat diakibatkan up-regulasi ekspresi gen yang terutama dipengaruhi aktivitas promotornya (Vandooren, Van Den Steen and Opdenakker, 2013). Substitusi C ke T pada polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T menyebabkan penurunan ikatan protein repressor di area promotor sehingga terjadi peningkatan ekspresi gen *MMP-9* (Zhang *et al.*, 1999; Medley *et al.*, 2004). Kadar m-RNA dan protein *MMP-9* lebih tinggi pada alel T dibandingkan pada alel C (Medley *et al.*, 2004). Kadar *MMP-9* yang lebih tinggi pada subjek dengan alel T juga dijumpai pada pasien dengan obesitas dan sindrom metabolik ((Andrade *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini, tidak dijumpai perbedaan bermakna ketiga genotip CC, CT dan TT antara kelompok kasus dan kontrol ($p>0,05$). Pada analisis alel C dan T kedua kelompok juga tidak dijumpai perbedaan bermakna. Hal ini dijumpai pula pada penelitian di Ceko dimana tidak dijumpai perbedaan proporsi genotip CC, CT dan TT antara kelompok PDR dan non-PDR dengan kelompok kontrol non-DM (Beránek *et al.*, 2008). Selain itu, analisis alel C dan T juga tidak memiliki perbedaan signifikan pada kelompok kasus dan kontrol penelitian Cina terkait hubungannya dengan kejadian nefropati dan tingkat keparahan penyakit jantung koroner (Zhang *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2016).

Peran *MMP-9* pada retinopati yakni dengan memperantarai kerusakan sawar-darah retina, degradasi matriks ekstrasel dan *remodeling* jaringan serta apoptosis sel Muller retina (Chen *et al.*, 2008; Tuuminen and Loukovaara, 2014). Proses ini berkaitan dengan hubungan timbal balik *MMP-9* dengan berbagai protein lain seperti TGF- β dan VEGF (Abu El-Asrar *et al.*, 2013; Di, Nie and Chen, 2016). Penelitian di Mesir menunjukkan hubungan signifikan polimorfisme VEGF -634G/C dengan kejadian PDR (Kamal, Eleinen and Siam, 2016). Selain itu, dijumpai juga hubungan signifikan peningkatan kadar TIMP-1 dan TIMP-4 dengan VEGF dan *MMP-9* pada retinopati diabetik dibandingkan pasien diabetik non-retinopati di Arab Saudi (Opdenakker and Abu El-Asrar, 2019).

Matriks metalloproteinase-2 (MMP-2) juga berperan pada retinopati diabetik melalui apoptosis sel endotel retina diperantarai induksi Hsp60 (Jobin, Butler and Overall, 2017).

Berbagai penelitian di atas menunjukkan peranan berbagai kompleks baik secara dependen maupun independent terhadap MMP-9 dalam proses terjadinya retinopati diabetik. Oleh karenanya, tidak dijumpainya hubungan polimorfisme *MMP-9* -1562C/T dengan retinopati diabetik pada penelitian ini dapat disebabkan terlibatnya protein ataupun gen lain dalam retinopati lebih bersifat dominan.

Faktor perbedaan etnis juga dianggap berhubungan dengan tidak dijumpainya hubungan yang signifikan antara polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T dengan risiko komplikasi mikrovaskular di antaranya retinopati diabetik (Zhang *et al.*, 2015). Hubungan bermakna alel T dengan risiko PDR penelitian sebelumnya tidak bisa dijadikan pedoman karena sampel yang digunakan hanya berasal dari etnis dan populasi tertentu yaitu India Utara sehingga merupakan penelitian *population-based* (Singh *et al.*, 2017). Sementara pada penelitian ini sampel yang diperoleh berasal dari beragam etnis dan perolehan sampel juga didasarkan pada kunjungan rawat jalan di rumah sakit sehingga merupakan penelitian *hospital-based*.

KESIMPULAN

1. Distribusi frekuensi genotip CC pada penelitian ini adalah 39 orang (75%) pada kelompok retinopati dan 23 orang (54,8%) pada kelompok kontrol. Distribusi frekuensi genotip CT pada polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T adalah 12 orang (23,1%) pada kelompok retinopati dan 19 orang (45,2%) pada kelompok kontrol. Distribusi frekuensi genotip TT pada polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T adalah 1 orang (1,9%) pada kelompok retinopati dan tidak dijumpai (0%) kelompok kontrol. Tidak dijumpai perbedaan bermakna proporsi genotip CC, CT, dan TT antara kelompok retinopati dan kelompok kontrol ($p>0,05$).
2. Distribusi frekuensi alel C adalah 90 alel (86,5%) pada kelompok retinopati dan 65 alel (77,4%) pada kelompok kontrol. Distribusi frekuensi alel T adalah 14 alel (13,5%) pada kelompok retinopati dan 19 alel (22,6%) pada kelompok kontrol. Tidak dijumpai perbedaan bermakna proporsi alel antara kelompok retinopati dan kelompok kontrol ($p>0,05$).
3. Distribusi variasi genetik pada populasi penelitian ini sesuai dengan keseimbangan *Hardy-Weinberg* dengan nilai $p>0,05$.
4. Polimorfisme gen *MMP-9* -1562C/T bukan merupakan faktor risiko retinopati diabetik pada pasien DM

DAFTAR PUSTAKA

- Abhary, S. *et al.* (2009) 'A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy', *Diabetes*, 58(9), pp. 2137–2147. doi: 10.2337/db09-0059.
- Abu El-Asrar, A. M. *et al.* (2013) 'Relationship between vitreous levels of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy', *PLoS ONE*, 8(12), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0085857.
- Altmann, C. and Schmidt, M. H. H. (2018) 'The role of microglia in diabetic retinopathy: Inflammation, microvasculature defects and neurodegeneration', *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms19010110.
- Amelia, R. and Harahap, N. S. (2019) 'Stroke among type 2 diabetes mellitus patients at Haji Adam Malik General Hospital, Medan, Indonesia', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(16), pp. 2643–2646. doi: 10.3889/oamjms.2019.743.
- American Diabetic Association (2020) '11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2020', *Diabetes care*, 43(January), pp. S135–S151. doi: 10.2337/dc20-S011.
- Andrade, V. L. *et al.* (2012) 'Functional polymorphism located in MMP-9 gene promoter is strongly associated with obesity', *DNA and Cell Biology*, 31(6), pp. 1054–1057. doi: 10.1089/dna.2011.1526.
- Antonetti, D. A., Klein, R. and Gardner, T. W. (2012) 'Diabetic retinopathy', *The New England Journal of Medicine*, 366, pp. 1227–1239.
- Barot, M. *et al.* (2013) 'Microvascular complications and diabetic retinopathy: Recent advances and future implications', *Future Medicinal Chemistry*, 5(3), pp. 301–314. doi: 10.4155/fmc.12.206.
- Beránek, M. *et al.* (2008) 'Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy', *Molecular Vision*, 14(June), pp. 1114–1121.
- Brownlee, M. (2005) 'The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism', *Diabetes*, 54(6), pp. 1615–1625. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1615.
- Cauwe, B., Steen, P. E. V. Den and Opdenakker, G. (2007) *The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases*, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. doi: 10.1080/10409230701340019.
- Chen, Y. *et al.* (2015) 'Apoptotic effect of mtrix metalloproteinases 9 in the

- development of diabetic retinopathy', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), pp. 10452-10459.
- Chen, Y. D. *et al.* (2008) 'MMP9 is involved in glycation end-products induced increase of retinal vascular permeability in rats and the therapeutic effect of minocycline', *Current Eye Research*, 33(11-12), pp. 977-983. doi: 10.1080/02713680802450984.
- Cho, N. H. *et al.* (2018) 'IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045', *Diabetes Research and Clinical Practice*. Elsevier B.V., 138, pp. 271-281. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
- Cui, N. *et al.* (2017) 'Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases HHS Public Access Author manuscript', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 147(617), pp. 1-73. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
- Cummins, P. M. (2012) 'Occludin: One Protein, Many Forms', *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), pp. 242-250. doi: 10.1128/mcb.06029-11.
- Di, Y., Nie, Q. Z. and Chen, X. L. (2016) 'Matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor expression change in experimental retinal neovascularization', *International Journal of Ophthalmology*, 9(6), pp. 804-808. doi: 10.18240/ijo.2016.06.02.
- Djuric, T. and Zivkovic, M. (2017) 'Overview of MMP Biology and Gene Associations in Human Diseases', in *Intech*. Belgrade, pp. 3-35. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- Do, D. V. *et al.* (2015) 'Blood pressure control for diabetic retinopathy', *Sao Paulo Medical Journal*, 133(3), pp. 278-279. doi: 10.1590/1516-3180.20151333T1.
- Duh, E. J., Sun, J. K. and Stitt, A. W. (2017) 'Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies', *JCI insight*, 2(14), pp. 1-13. doi: 10.1172/jci.insight.93751.
- Emptage, N. P. *et al.* (2014) *Preferred Practice Pattern: Diabetic retinopathy*, American Academy of Ophthalmology. Edited by S. Garratt. American Academy of Ophthalmology. doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
- Feng, S. *et al.* (2016) 'Matrix Metalloproteinase-9 -1562C/T Gene Polymorphism Is Associated with Diabetic Nephropathy', *BioMed Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/1627143.
- Fitriani and Sihotang, A. D. (2017) '濟無No Title No Title', *Jurnal Kesehatan Prima*, 11(2), pp. 137-140. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Flaxel, C. J. *et al.* (2020) 'Diabetic Retinopathy Preferred Practice Pattern®', *Ophthalmology*, 127(1), pp. P66-P145. doi: 10.1016/j.ophttha.2019.09.025.
- Gardner, T. W. and Davila, J. R. (2017) 'The Neurovascular Unit and the Pathophysiologic Basis of Diabetic Retinopathy', *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 255(1), pp. 1-6. doi: 110.1007/s00417-016-3548-y.

- Ghulam Mohammad and Kowluru, R. A. (2012) 'Diabetic Retinopathy and Signaling Mechanism for Activation of Matrix Metalloproteinase-9', *Journal of Cellular Physiology*, 227(3), pp. 1052-1061. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Giebel, S. J. *et al.* (2005) 'Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alternation of the blood-retinal barrier', *Laboratory Investigation*, 85(5), pp. 597-607. doi: 10.1038/labinvest.3700251.
- De Groef, L. *et al.* (2015) 'Matrix metalloproteinases in the mouse retina: A comparative study of expression patterns and MMP antibodies Retina', *BMC Ophthalmology*. *BMC Ophthalmology*, 15(1), pp. 1-16. doi: 10.1186/s12886-015-0176-y.
- Hannocks, M. J. *et al.* (2019) 'The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes', *Matrix Biology*. International Society of Matrix Biology, 75-76, pp. 102-113. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.007.
- Hollborn, M. *et al.* (2007) 'Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(9), pp. 4360-4367. doi: 10.1167/iovs.06-1234.
- Huang, H. (2018) 'Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: Recent advances', *Sensors (Switzerland)*, 18(10), pp. 5-7. doi: 10.3390/s18103249.
- Jacqueminet, S. *et al.* (2006) 'Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in type 1 diabetic patients with and without retinopathy', *Clinica Chimica Acta*, 367(1-2), pp. 103-107. doi: 10.1016/j.cca.2005.11.029.
- Jayashree, K. *et al.* (2018) 'Circulating matrix modulators (MMP-9 and TIMP-1) and their association with severity of diabetic retinopathy', *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. Diabetes India, 12(6), pp. 869-873. doi: 10.1016/j.dsx.2018.05.006.
- Jenkins, A. J. *et al.* (2015) 'Biomarkers in diabetic retinopathy', *Review of Diabetic Studies*, 12(1-2), pp. 159-195. doi: 10.1900/RDS.2015.12.159.
- JM, S., M, C. and DM, S. (2017) 'Diabetic retinopathy', *Endotext (NCBI BookShelf)*.
- Jobin, P. G., Butler, G. S. and Overall, C. M. (2017) 'New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1864(11), pp. 2043-2055. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.013.
- Kamal, A., Eleinen, K. A. and Siam, I. (2016) 'Association of vascular endothelial growth factor-634G/C and receptor for advanced glycation end products G82S gene polymorphisms with diabetic retinopathy', *International Journal of Ophthalmology*, 9(8), pp. 1106-1111. doi: 10.18240/ijo.2016.08.04.
- Kaur, C. *et al.* (2015) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Retinal Ganglion

- Cell Death in Hypoxic-Ischemic Injuries', *Journal of Neurology and Experimental Neuroscience*, pp. 10-19. doi: 10.17756/jnen.2015-003.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2014) *Situasi dan Analisis Diabetes, Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta Selatan.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia (2019) *HARI DIABETES SEDUNIA TAHUN 2018*. Jakarta Selatan.
- Kilpatrick, E. S. *et al.* (2012) 'Does severe hypoglycaemia influence microvascular complications in Type1 diabetes? An analysis of the Diabetes Control and Complications Trial database', *Diabetic Medicine*, 29(9), pp. 1195-1198. doi: 10.1111/j.1464-5491.2012.03612.x.
- Klein, T. and Bischoff, R. (2011) 'Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases', *Amino Acids*, 41(2), pp. 271-290. doi: 10.1007/s00726-010-0689-x.
- Kowluru, R. A. (2010) 'Role of matrix metalloproteinase-9 in the development of diabetic retinopathy and its regulation by H-Ras', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(8), pp. 4320-4326. doi: 10.1167/iovs.09-4851.
- Kowluru, R. A. *et al.* (2011) 'Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage', *Diabetes*, 60(11), pp. 3023-3033. doi: 10.2337/db11-0816.
- Kowluru, R. A. and Mishra, M. (2017) *Regulation of Matrix Metalloproteinase in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy*. 1st edn, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.004.
- Kowluru, R. A., Santos, J. M. and Zhong, Q. (2014) 'Sirt1, A negative regulator of matrix metalloproteinase-9 in diabetic retinopathy', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(9), pp. 5653-5660. doi: 10.1167/iovs.14-14383.
- Kowluru, R. A. and Shan, Y. (2017) 'Role of Oxidative Stress in Epigenetic Modification of MMP-9 Promoter in the Development of Diabetic Retinopathy', *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 255(5), pp. 955-962. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Kowluru, R. A., Shan, Y. and Mishra, M. (2016) 'Dynamic DNA methylation of matrix metalloproteinase-9 in the development of diabetic retinopathy', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 96(10), pp. 1040-1049. doi: 10.1038/labinvest.2016.78.
- Kowluru, R. A., Zhong, Q. and Santos, J. M. (2012) 'Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9', *Expert Opin Investig Drugs*,

- 21(6), pp. 797–805. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Krishnan, G. and Subawa, A. N. (2017) 'Prevalence of diabetic retinopathy among diabetes mellitus type 2 patients at Diabetes Center of Sanglah General Hospital, Bali', *Intisari Sains Medis*, 9(1), pp. 49–51. doi: 10.15562/ism.v9i1.155.
- Lee, R., Wong, T. Y. and Sabanayagam, C. (2015) 'Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss', *Eye and Vision*. *Eye and Vision*, 2(1), pp. 1–25. doi: 10.1186/s40662-015-0026-2.
- Manigrasso, Michael B. *et al.* (2014) 'Unlocking the Biology of RAGE in Diabetic Microvascular Complications', *Trends Endocrinol Metab*, 25(1), pp. 1–18. doi: 10.1016/j.tem.2013.08.002.
- Medley, T. L. *et al.* (2004) 'Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(8), pp. 1479–1484. doi: 10.1161/01.ATV.0000135656.49158.95.
- Mishra, M. and Kowluru, R. A. (2017) 'role of PARP-1 as a novel transcriptional regulator of MMP-9 in diabetic retinopathy', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(7), pp. 1761–1769. doi: 10.1016/j.bbadis.
- Mori, K. *et al.* (2019) 'A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells', *FEBS Journal*, pp. 459–478. doi: 10.1111/febs.14671.
- Nagayach, A., Patro, N. and Patro, I. (2014) 'Astrocytic and microglial response in experimentally induced diabetic rat brain', *Metabolic brain disease*, 29(3), pp. 747–761. doi: 10.1007/s11011-014-9562-z.
- Nentwich, M. M. (2015) 'Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus', *World Journal of Diabetes*, 6(3), p. 489. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.489.
- Nissinen, L. and Kähäri, V.-M. (2014) 'Matrix metalloproteinases in inflammation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), pp. 2571–2580. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.007.
- Opdenakker, G. and Abu El-Asrar, A. (2019) 'Metalloproteinases mediate diabetes-induced retinal neuropathy and vasculopathy', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 76(16), pp. 3157–3166. doi: 10.1007/s00018-019-03177-3.
- Rossino, M. G. and Casini, G. (2019) 'Nutraceuticals for the treatment of diabetic retinopathy', *Nutrients*, 11(4), pp. 1–29. doi: 10.3390/nu11040771.
- Rübsam, A., Parikh, S. and Fort, P. E. (2018) 'Role of inflammation in diabetic retinopathy', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), pp. 1–31. doi: 10.3390/ijms19040942.
- Santos, J. M. *et al.* (2013) 'Interrelationship between activation of matrix

- metalloproteinases and mitochondrial dysfunction in the development of diabetic retinopathy', *Biochemical Biophysics Res Commun*, 438(4), pp. 1-12. doi: 10.1016/j.bbrc.
- Sasongko, M. B. *et al.* (2017) 'Prevalence of Diabetic Retinopathy and Blindness in Indonesian Adults With Type 2 Diabetes', *American Journal of Ophthalmology*. Elsevier Inc., 181, pp. 79-87. doi: 10.1016/j.ajo.2017.06.019.
- Shi, R. *et al.* (2018) 'Effects of lipid-lowering agents on diabetic retinopathy: A meta-analysis and systematic review', *International Journal of Ophthalmology*, 11(2), pp. 287-295. doi: 10.18240/ijo.2018.02.18.
- Simó, R., Sundstrom, J. M. and Antonetti, D. A. (2014) 'Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: The role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy', *Diabetes Care*, 37(4), pp. 893-899. doi: 10.2337/dc13-2002.
- Singh, Kanhaiya *et al.* (2013) 'A functional single nucleotide polymorphism -1562c>t in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers', *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 12(3), pp. 199-204. doi: 10.1177/1534734613493289.
- Singh, Kanhaiya *et al.* (2017) 'Association of functional SNP-1562C > T in MMP9 promoter with proliferative diabetic retinopathy in north Indian type 2 diabetes mellitus patients', *Journal of Diabetes and its Complications*. Elsevier Inc., 31(12), pp. 1648-1651. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.08.010.
- Tewari, S., Santos, J. M. and Kowluru, R. A. (2012) 'Damaged mitochondrial DNA replication system and the development of diabetic retinopathy', *Antioxidants and Redox Signaling*, 17(3), pp. 492-504. doi: 10.1089/ars.2011.4333.
- Thakur, N. *et al.* (2018) 'Genetic association of -1562C>T polymorphism in the MMP9 gene with primary glaucoma in a north Indian population', *PLoS ONE*, 13(2), pp. 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0192636.
- Tuuminen, R. and Loukovaara, S. (2014) 'High intravitreal TGF-β1 and MMP-9 levels in eyes with retinal vein occlusion', *Eye (Basingstoke)*. Nature Publishing Group, 28(9), pp. 1095-1099. doi: 10.1038/eye.2014.137.
- Vaisar, T. *et al.* (2009) 'MMP-9 sheds the β2 integrin subunit (CD18) from macrophages', *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(5), pp. 1044-1060. doi: 10.1074/mcp.M800449-MCP200.
- Vandooren, J., Van Den Steen, P. E. and Opdenakker, G. (2013) 'Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(3), pp. 222-272. doi: 10.3109/10409238.2013.770819.
- Verma, S. *et al.* (2015) 'An overview of matrix metalloproteinase 9 polymorphism and gastric cancer risk', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(17), pp.

- 7393–7400. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.17.7393.
- Wong, T. Y. *et al.* (2008) 'Prevalence and Risk Factors for Diabetic Retinopathy. The Singapore Malay Eye Study', *Ophthalmology*, 115(11), pp. 1869–1875. doi: 10.1016/j.ophttha.2008.05.014.
- Xu, J. *et al.* (2014) 'Ten-year cumulative incidence of diabetic retinopathy. The beijing eye study 2001/2011', *PLoS ONE*, 9(10), pp. 5–10. doi: 10.1371/journal.pone.0111320.
- Yadav, S. S. *et al.* (2014) 'High Serum Level of Matrix Metalloproteinase 9 and Promoter Polymorphism - 1562 C:T as a New Risk Factor for Metabolic Syndrome', *DNA and Cell Biology*, 33(11), pp. 816–822. doi: 10.1089/dna.2014.2511.
- Yau, J. W. Y. *et al.* (2012) 'Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy', *Diabetes Care*, 35(3), pp. 556–564. doi: 10.2337/dc11-1909.
- Yin, L. *et al.* (2020) 'Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in diabetic patients: A community based cross-sectional study', *Medicine (United States)*, 99(9). doi: 10.1097/MD.00000000000019236.
- Zhang, B. *et al.* (1999) 'Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis', *Circulation*, 99(14), pp. 1788–1794. doi: 10.1161/01.CIR.99.14.1788.
- Zhang, M. M. *et al.* (2018) 'Association between matrix metalloproteinase 9 C-1562T polymorphism and the risk of coronary artery disease: An update systematic review and meta-analysis', *Oncotarget*, 9(10), pp. 9468–9479. doi: 10.18632/oncotarget.23293.
- Zhang, Z. *et al.* (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), pp. 8023–8033. doi: 10.3390/ijerph120708023.
- Zhao, X. and Benveniste, E. N. (2008) 'Transcriptional Activation of Human Matrix Metalloproteinase-9 Gene Expression by Multiple Coactivators', *Journal Molecular Biology*, 383(5), pp. 945–956. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Zhou, Y. *et al.* (2018) 'Relationship between dyslipidemia and diabetic retinopathy: A systematic review and meta-analysis', *Medicine (United States)*, 97(36). doi: 10.1097/MD.00000000000012283.