

ЭКСПРЕССИЯ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ИШЕМИЗИРОВАННОМ МИОКАРДЕ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ АЛЛОГЕННОГО БИОМАТЕРИАЛА

Лебедева А. И.¹, Муслимов С. А.¹, Гареев Е. М.¹, Попов С. В.², Афанасьев С. А.², Кондратьева Д. С.²

Цель. Определить уровни экспрессии MMP-9 и TIMP-2 после интрамиокардиального введения аллогенного биоматериала (БМА) в ишемизированный миокард крыс.

Материал и методы. Использовали 100 крыс породы Вистар, которым осуществляли лигирование коронарной артерии. В опытной группе (n=50) одновременно с коронароокклюзией вводили суспензию БМА в количестве 12 мг. Применяли общегистологические исследования: окраска гематоксилином и эозином, по Маллори; иммуногистохимические (MMP-9, TIMP-2, CD68); морфометрические: определение индекса площади рубца (ИПР), количество MMP-9, TIMP-2, CD68 позитивных клеток; статистические.

Результаты. Показано, что в опытной группе после имплантации БМА наблюдались меньшие, чем в контроле: значения ИПР (в 2,74 раза $p < 0,05 \div < 0,0001$), численность MMP-9⁺ клеток ($p < 0,001$) и макрофагов CD68⁺ ($p < 0,05$), а также манифестация протеолитических процессов и размер зоны поражения. Напротив, количество TIMP-2⁺ клеток в опытной группе был выше, чем в контрольной группе ($p < 0,0004$).

Заключение. Продукты резорбции аллогенного биоматериала Аллоплант влияют на баланс металлопротеиназ и их ингибиторов в миокарде после ишемического повреждения. Этот эффект способен оказать значительное влияние на процессы ремоделирования миокарда и формирование рубца.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(7):73–79
<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-7-73-79>

Ключевые слова: биоматериал Аллоплант, инфаркт миокарда, MMP-9, TIMP-2.

Конфликт интересов: не заявлен.

¹ФГБУ Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Минздрава России, Уфа; ²Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия.

Лебедева А. И.* — д.б.н., с.н.с. отдела морфологии, ORCID: 0000-0002-9170-2600, Муслимов С. А. — д.м.н., в.н.с., зав. отделом морфологии, ORCID: 0000-0002-9076-0251, Гареев Е. М. — к.б.н., доцент, с.н.с. лаборатории нейрофизиологии, ORCID: 0000-0002-6561-1892, Попов С. В. — академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, директор, ORCID: 0000-0002-9050-4493, Афанасьев С. А. — д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, ORCID: 0000-0001-6066-3998, Кондратьева Д. С. — к.м.н., н.с. лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, ORCID: 0000-0002-4004-2997.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): Jeol02@mail.ru

БМА — биоматериал Аллоплант, ИПР — индекс площади рубца, MMP — металлопротеиназа, TIMP — ингибитор металлопротеиназ.

Рукопись получена 25.09.2017

Рецензия получена 01.12.2017

Принята к публикации 25.12.2017

METALLOPROTEASES AND INHIBITORS EXPRESSION IN MYOCARDIUM UNDER ISCHEMIC CONDITIONS AFTER ALLOGENIC BIOMATERIAL INTRODUCTION

Lebedeva A. I.¹, Muslimov S. A.¹, Gareev E. M.¹, Popov S. V.², Afanasiev S. A.², Kondratieva D. S.²

Aim. To assess the expression of MMP-9 and TIMP-2 after intramyocardial injection of the allogenic biomaterial (AB) into ischemized myocardium in rodents.

Material and methods. One hundred Wistar rodents were used, who underwent ligation of coronary artery. The experiment group (n=50), together with coronary occlusion, received the suspension of AB 12 mg. General histology was applied: hematoxyline and eosine, by Mallori; immune histochemistry (MMP-9, TIMP-2, CD68); morphometry: index of the scar area (ISA), amount of MMP-9, TIMP-2, CD68-positive cells.

Results. It was shown that in the experimental group, after implantation of AB there were lesser than in controls values of ISA (2,74 times, $p < 0,05 \div < 0,0001$), numbers of MMP-9⁺ cells ($p < 0,001$) and macrophages CD68⁺ ($p < 0,05$), as the manifestation of proteolysis and area of lesion. On the contrary, amount of TIMP-2⁺ cells in the experimental group was higher than in the control ($p < 0,0004$).

Conclusion. Resorption of allogenic material (Alloplant) products does influence the balance of metalloproteinases and their inhibitors in the myocardium after ischemic lesion. This effect might influence the processes of myocardial remodelling and scar formation.

Russ J Cardiol. 2018;23(7):73–79

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-7-73-79>

Key words: biomaterial Alloplant, myocardial infarction, MMP-9, TIMP-2.

Conflicts of Interest: nothing to disclose.

¹Russian Center of the Eye and Plastic Surgery of the Ministry of Health, Ufa; ²SRI of Cardiology, Tomskiy National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia.

Lebedeva A. I. ORCID: 0000-0002-9170-2600, Muslimov S. A. ORCID: 0000-0002-9076-0251, Gareev E. M. ORCID: 0000-0002-6561-1892, Popov S. V. ORCID: 0000-0002-9050-4493, Afanasiev S. A. ORCID: 0000-0001-6066-3998, Kondratieva D. S. ORCID: 0000-0002-4004-2997.

Возможность стимуляции кардиомиогенеза постишемического миокарда до сих пор остается актуальной задачей. Как правило, формированию рубца в мышечной ткани способствует стремительное накопление стромальных элементов и низкая

скорость или отсутствие репликации мышечных клеток [1]. Изучение кардиопротекторных механизмов в ишемически поврежденной сердечной мышечной ткани позволяет обосновать и оптимизировать стратегию её восстановления и нивелировать рубец.

В модификациях заживления сердечной мышечной ткани существенную роль играет система цинкзависимых ферментов — матриксных металлопротеиназ (ММР) и их ингибиторов (TIMP). ММР обуславливают разрушение компонентов межклеточного матрикса, таких как компоненты базальных мембран (коллаген IV типа, ламинин, энтактин, протеогликаны и гликозаминогликаны), коллагены I, II, III типов, фибронектин, нефибриллярные коллагены, эластин и расширение зоны поражения, что связано с прогрессированием коллагеногенеза [2].

В этом аспекте перспективным представляется применение диспергированного аллогенного биоматериала. Продукты биodeградации биоматериала ингибируют профиброгенную клеточную активность и снижают скорость коллагенообразования, тем самым стимулируют клеточные элементы тканевого ложа [3, 4]. В связи с этим, целью исследования явилось определение уровня ММР-9 и его ингибитора TIMP-2 после интрамиокардиального введения биоматериала Аллоплант (БМА) в ишемизированный миокард.

Материал и методы

Экспериментальные исследования с применением БМА были проведены на 100 крысах-самцах породы Вистар массой 0,18–0,25 кг. Все животные были разделены на две группы — контрольную (n=50) и опытную (n=50). Моделирование инфаркта миокарда осуществляли следующим образом: после левосторонней торакотомии в миокарде левого желудочка под внутримышечным наркозом (раствор золетила или телазола) осуществляли перевязку *r. interventricularis paraconalis a. coronarii sin.* путем наложения одного шва “викрил”. Сердце выводили за пределы грудной клетки и накладывали лигатуру на артерию. Рану засыпали антибиотиком и, удалив воздух из грудной полости, послойно зашивали.

В опытной группе лигирование артерии сопровождали введением суспензии БМА в бассейн стенозированной артерии. Суммарное количество введенного вещества составляло 12 мг. Животных выводили из опыта путем инсультации летальной дозы паров эфира через 3, 7, 14, 30, 45 сут. В контрольной и опытной группах на каждую точку исследования использовали по 10 животных.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя и руководством по лабораторным животным и альтернативным моде-

лям в биомедицинских исследованиях [5]. Животные находились в стационарных клетках, индивидуально. В качестве корма был стандартный комбикорм гранулированный полнорационный ПЗК-92. Кормление животных осуществлялось по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводную очищенную воду животным давали без ограничений в поилках.

Биоматериал Аллоплант® разработан в ФГБУ “Всероссийский центр глазной и пластической хирургии” МЗ РФ г. Уфы (руководитель — профессор Э. Р. Мулдашев). Указанный биоматериал изготавливается согласно ТУ 42-2-537-87, сертифицирован и разрешен к применению в клинической практике приказом МЗ СССР № 87901-87 от 22.07.1987г. Для настоящего исследования аллогенный биоматериал был приготовлен из сухожилий крыс по технологии Аллоплант® и диспергирован до размера частиц 50–80 мкм.

Гистологические исследования. Сердца фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы готовили на микротоме LEICA RM 2145 (Германия), которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори.

Иммуногистохимические исследования. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). В качестве первых антител применяли: ММР-9, TIMP-2, CD68 в разведении 1:300 (Santa Cruz Biotechnology, США). Для демаскировки использовали непрямую стрептавидин-биотиновую систему детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Оценку специфичности реакции проводили при окрашивании срезов без первых антител. Площадь окрашивания и суммарную площадь просветов кровеносных сосудов производили в 20 полях зрения каждого образца (n=6) при увеличении ×400. Исследование и визуализацию препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DMD 108 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения и микроскопа AxioImager Z1, оснащенного фотонасадкой ProgRes C3 и программой анализа изображений Axiovision (Zeiss, Германия).

Морфометрические исследования. С целью определения размера постинфарктного рубца миокарда каждое сердце нарезали поперек на 5 секторов. Из них изготавливали гистологические препараты и подвергали числовой и морфологической обработке. Всего для морфометрического исследования было использовано 500 срезов. Индекс площади рубца (ИПР) сердец крыс измеряли на препаратах, окрашенных по Маллори, с использованием программы ITEM (Olympus) следующим образом: отно-

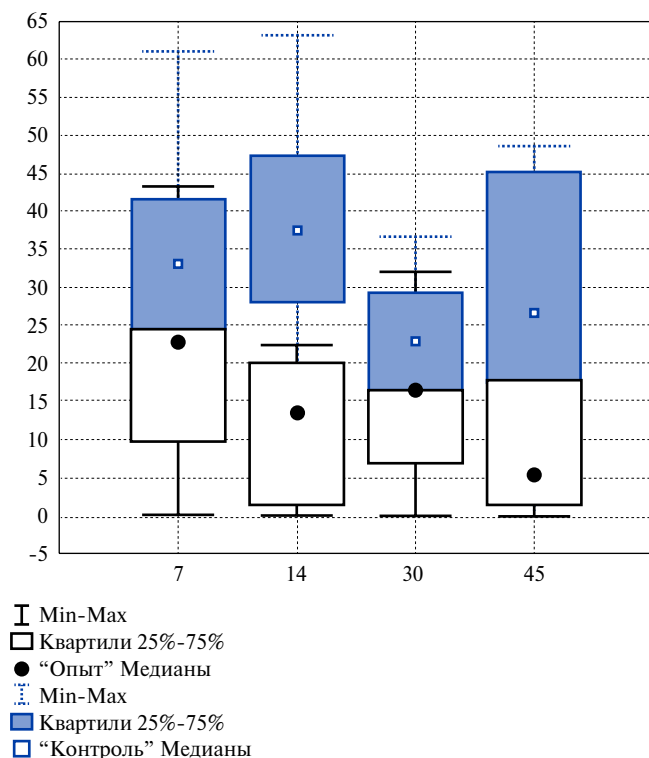


Рис. 1. Изменения ИПР в контрольной и в опытной группах.

Примечание: по оси абсцисс — дни. По оси ординат — ИПР (%).

шение площади рубца к площади стенки левого желудочка умножали на 100%.

Осуществлялся подсчет позитивно окрашенных клеток против антител к MMP-9, TIMP-2, CD68 в перифокальных зонах.

Статистика. Структура и характер данных позволяли использовать метод двухфакторного дисперсионного анализа. Анализ данных ИПР осуществлялся с применением непараметрических (ранговых) методов — однофакторного дисперсионного анализа по Краскелу-Уоллесу и сравнения некоррелированных данных методом Манна-Уитни [6]. Построение диаграммы осуществлялось в программе Statistica 6,0.

Результаты

В контрольной группе ИПР статистически значимо не зависел от сроков наблюдения ($\chi^2=6,3$, $p>0,09$). Однако через 30 дней ИПР оказались значимо меньше, чем через 7-14 сут. после начала эксперимента ($p<0,02$ и $p<0,005$, соответственно). Через 45 сут. не было значимых отличий от всех предшествующих сроков наблюдения ($p>0,45$). Медианы распределения ИПР в контрольной группе на всем протяжении наблюдений имели значения не ниже 20%. После применения БМА значения ИПР также незначимо зависели от сроков наблюдения ($\chi^2=5,7$, $p>0,12$). Однако, как это видно на рисунке 1, значения этого параметра постепенно снижались от начала к концу

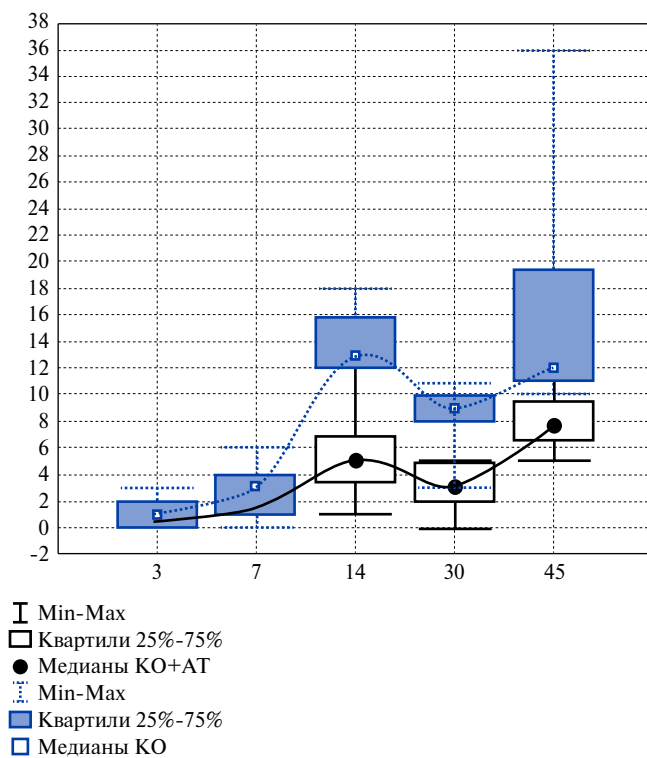
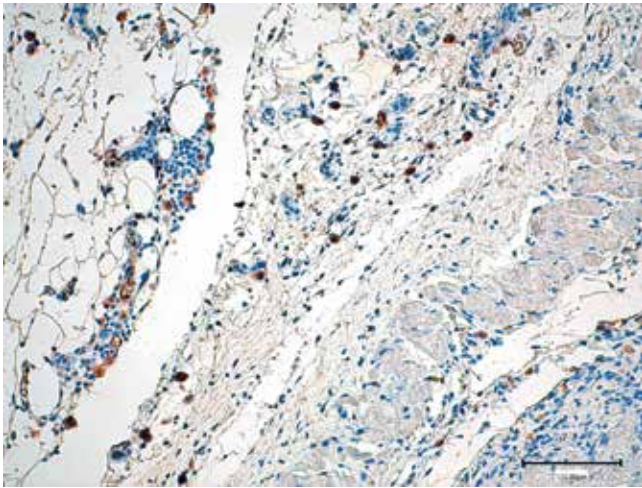


Рис. 2. Численность MMP-9⁺ клеток в постинфарктомическом миокарде в контрольной группе (синий) и после введения БМА (черный).

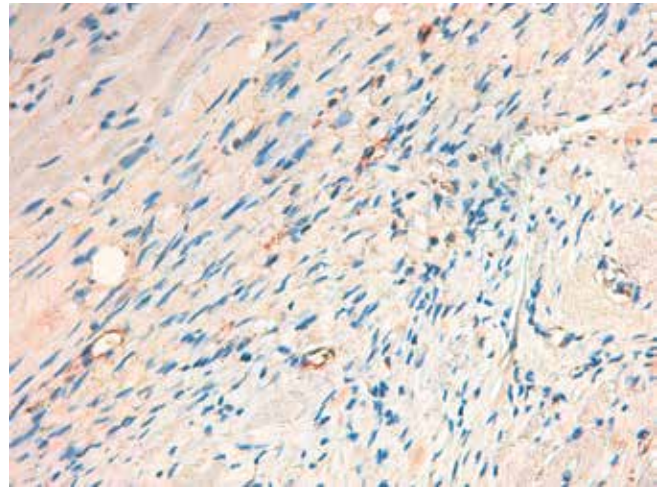
Примечание: по оси абсцисс — “дни”, по оси ординат — количество клеток. ГДИ — границы доверительных интервалов для средних значений площади, $\pm CO$ — стандартная ошибка среднего значения.

наблюдений. Медианы распределения этого параметра через 7 сут. составляли 22,7%, и уже на 14-е сут. значимо ($p<0,02$) снижались до 13,4%, а на 30-е и 45-е сут. до 16% и 5,2% ($p>0,14$ и $p<0,02$, соответственно). Различия между 14-м, 30-м и 45-м днями оказались статистически незначимыми ($p>0,23 \div 0,75$). Выявлено, что нулевые значения ИПР имели место уже на 7-е сут. после коронароокклюзии. Сравнение контрольной и опытной групп в различные сроки наблюдений показали, что ИПР после имплантации БМА в опытной группе на любом сроке статистически значимо меньше ($p<0,05$ — $<0,0001$), чем в контроле. Через 45 сут. наблюдения ИПР в контрольной группе составлял $26,65 \pm 16,1\%$, а в опытной после применения аллогенного биоматериала — $9,72 \pm 10,8\%$, что в 2,74 раза меньше (рис. 1).

Дисбаланс системы “протеолиз-антипротеолиз” при воспалении инициируется нейтрофилами и макрофагами. Ключевую роль играют такие цитокины, как металлопротеазы и их ингибиторы [7]. В контрольной группе во временной период от 3 до 14 сут. наблюдения тенденция к увеличению численности MMP9⁺ клеток была высоко значима, Chi-Square = 80,2 ($p<0,0001$). Различия последовательных значений по критерию Манна-Уитни были статистически

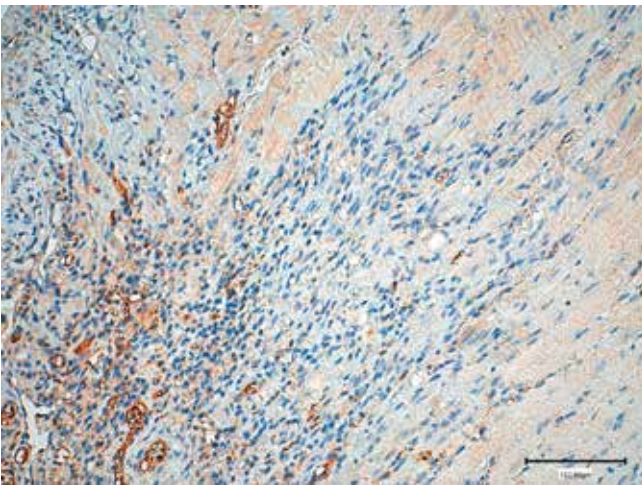


А

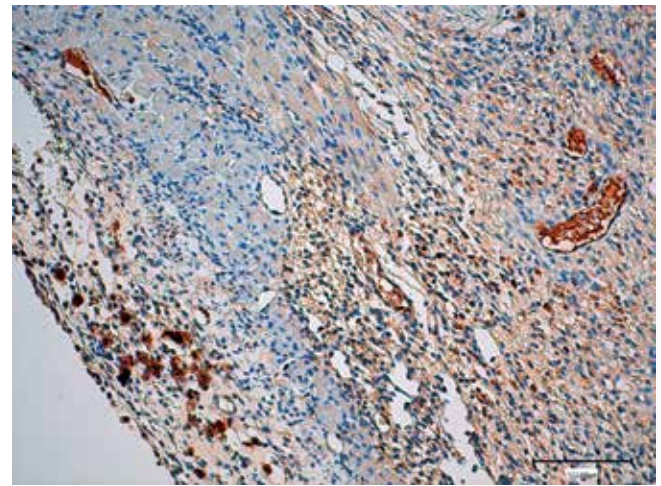


Б

Рис. 3 (А, Б). Реакция MMP-9⁺ в миокарде крысы после: **А** – коронароокклюзии (увел. x400) и **Б** — коронароокклюзии и введения БМА (увел. x600) через 45 сут.
Примечание: непрямой иммунопероксидазный метод выявления MMP-9⁺ с докраской гематоксилином.



А



Б

Рис. 4 (А, Б). Реакция Timpr-2⁺ в миокарде крысы через 7 суток после: **А** – коронароокклюзии (контрольная группа) и **Б** — коронароокклюзии и введения БМА.
Примечание: непрямой иммунопероксидазный метод выявления Timpr-2⁺ с докраской гематоксилином. Увел. x400.

значимы, включая 3 сут. ($p < 0,003$) и 7 сут. ($p < 0,0001$), кроме 14–45 сут. ($p > 0,35$), где популяция клеток с данным фенотипом поддерживалась и не снижалась.

В опытной группе $\text{Chi-Square} = 57,7$, тенденция к подъему клеток MMP9⁺ была также статистически высоко значима ($p < 0,0001$). По критерию Манна-Уитни все последовательные значения попарно различались ($p < 0,05$). При сравнении контрольной и опытной групп между собой, а не во времени, численность MMP9⁺ клеток в контрольной группе была выше, чем в опытной ($p < 0,001$) по всем срокам наблюдения, кроме 3-го ($p > 0,26$) и 7-го ($p > 0,05$) дней, где происходила ишемически индуцированная острая воспалительная реакция (рис. 2). MMP-9 и TIMP-2 локализовались в цитоплазме клеток. В интерстиции цитокины не определялись (рис. 3, 4).

Фактор численности Timpr-2⁺ клеток и фактор времени в контрольной группе был статистически высоко значим: (Критерий Краскела-Уоллеса) $\text{Chi-Square} = 44,8$, $p < 0,0001$. Различия последовательных значений (критерий Манна-Уитни) статистически значимы ($p < 0,002$ и менее) для всех пар, кроме 7–30 сут. ($p > 0,08$) и 14–45 сут. ($p > 0,48$).

В опытной группе после введения БМА тенденция к подъему и снижению высоко значима ($\text{Chi-Square} = 28,7$, $p < 0,0001$). По критерию Манна-Уитни все последовательные значения в периоды 3–7 сут., 7–14 сут., 3–14 сут. попарно не различались (от $p > 0,06$ до $p > 23$) и держались на достаточно высоком уровне. Через 14 сут. количество Timpr-2⁺ клеток начинало постепенно снижаться ($p < 0,004$ и менее), что соответствовало затуханию пластических процессов в миокарде.

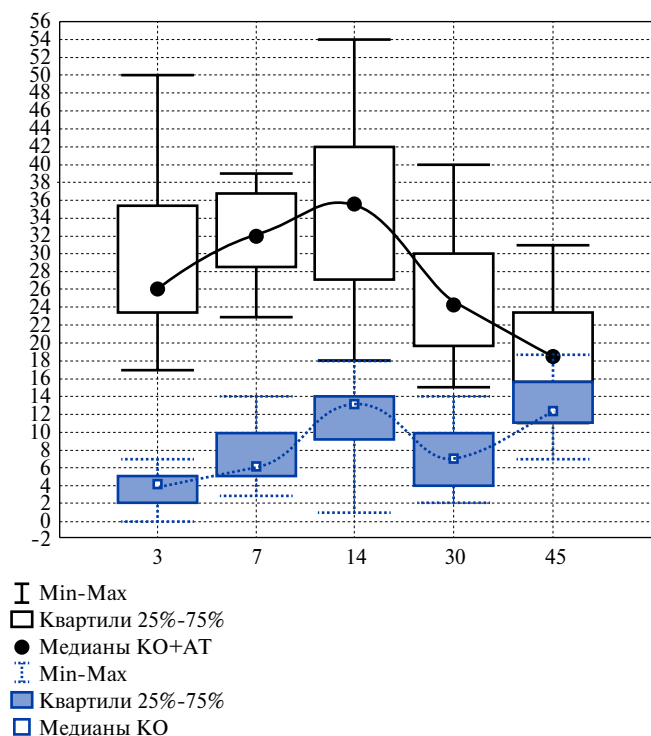


Рис. 5. Численность Timpr-2⁺ клеток в постишемическом миокарде в контрольной группе (синий график) и после введения БМА (черный график).

Примечание: по оси абсцисс — «дни». По оси ординат — количество клеток. ГДИ — границы доверительных интервалов для средних значений площади, ±CO — стандартная ошибка среднего значения.

Уровень численности Timpr-2⁺ клеток в опытной группе был выше, чем в контрольной группе, где БМА не применялся ($p < 0,001$ и менее), включая 45 сут. ($p < 0,0004$) (рис. 5).

В контрольной группе тенденция к подъему и последующему спаду численности CD68⁺ макрофагов во временном интервале в целом высоко значима (Критерий Краскела-Уоллеса) Chi-Square = 76,3, ($p < 0,0001$). Различия последовательных значений по критерию Манна-Уитни статистически значимы при $p < 0,04$, включая сроки 30 и 45 сут. и для всех прочих пар ($p < 0,0001$).

В опытной группе после введения БМА Chi-Square = 45,2, ($p < 0,0001$) тенденция к подъему и спаду макрофагов также была в целом высоко значима во времени, что обуславливало течение воспалительной реакции после коронароокклюзии и последующее ремоделирование миокарда. Не различались по критерию Манна-Уитни сроки 3-14 сут. ($p > 0,67$) и 14-30 сут. ($p > 0,15$) при попарном сравнении.

В целом, количество макрофагов CD68⁺ в контрольной группе статистически значимо превышало численность данных клеток в опытной группе в реактивной зоне миокарда а период наблюдения 3-14 сут. ($p < 0,003$ и менее). В период 30-45 сут. в контрольной группе происходило затухание процессов ремодели-

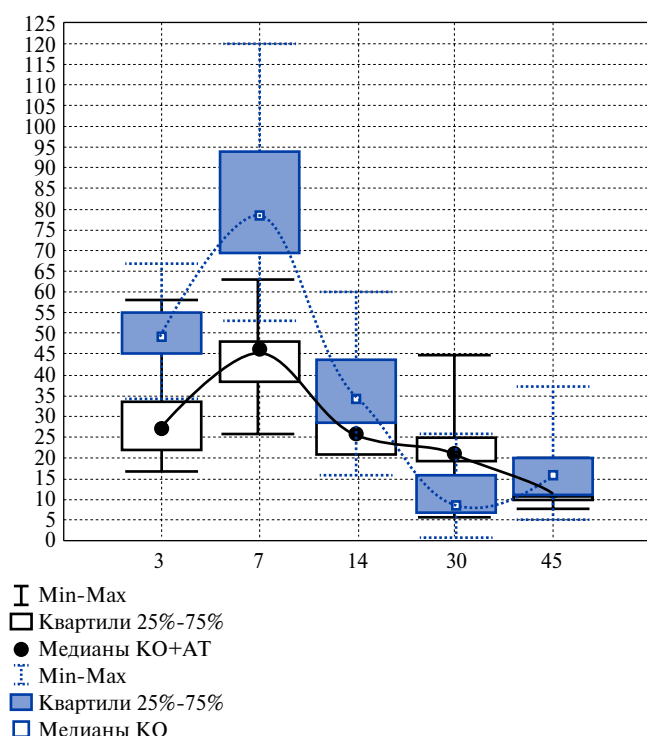


Рис. 6. Количество макрофагов CD68⁺ в миокарде крысы в контрольной группе (синий график) и после введения БМА (черный график).

Примечание: по оси абсцисс — «дни». По оси ординат — количество клеток. ГДИ — границы доверительных интервалов для средних значений площади, ±CO — стандартная ошибка среднего значения.

рования миокарда и формирование рубца, что вызвало снижение числа макрофагов в обеих группах ($p > 0,12$) (рис. 6).

Так, в контрольной группе после коронароокклюзии была выражена реакция MMP-9⁺ клеток, что сопровождалось манифестацией протеолитических процессов в ткани и увеличением зоны поражения. В опытной группе после коронароокклюзии и применения аллогенного биоматериала в миокарде превалировала инфильтрация Timpr-2⁺ клетками. Различия секреторной активности металлопротеиназ и их ингибиторов в экспериментальных группах были вызваны различным количественным составом инфильтрирующих макрофагов CD68⁺.

Обсуждение

Известно, что MMP-9 экспрессируется различными клетками соединительной ткани: мезенхимными клетками, фибробластами, нейтрофилами, моноцитами, макрофагами, а также гладкомышечными клетками кровеносных сосудов и самими кардиомиоцитами [7]. В данном исследовании цитокин MMP-9 не определялся в мышечных клетках, а секретиrowался преимущественно в цитоплазме макрофагов в грануляционной ткани, которая развивалась на фоне поврежденных кардиомиоцитов в реактивной зоне.

В начальные сроки ишемии (3-7 сут.) в период острого воспаления преобладали полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги. На рисунке 2 показано, что численность ММР-9⁺ клеток в опытной и контрольной группах практически не отличались в реактивной зоне повреждения. В период 14-45 сут., происходило накопление клеток пролиферативной фазы воспаления, связанных с миграцией макрофагов, фибробластов, миофибробластов. Численность ММР-9⁺ клеток в контрольной группе значительно превышала количество данных клеток в опытной группе. Можно считать, что клетками ответственными за секрецию ММР-9 в настоящем исследовании являются макрофаги.

Металлопротеиназы всегда рассматривались как ферменты деградации межклеточного матрикса. Однако ММР-9 является профиброгенным фактором, поскольку обеспечивает процессинг латентной формы TGF- β , переводя его в активную форму, инициирующую рост соединительной ткани [8-10]. Повышенный уровень синтеза ММР-9 макрофагами в миокарде может указывать на интенсивный фибриллогенез в зоне ишемии, формирование и экспансию рубца (рис. 1).

Большое количество исследований посвящено изучению активации и ингибированию MMPs во внеклеточном матриксе при деструктивных заболеваниях миокарда с целью разработки фармакологических способов снижения фибропластических процессов и стимуляции пролиферативной активности кардиомиогенных клеток. Гомеостаз внеклеточного матрикса в сердечной мышечной ткани зависит от баланса металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов [11].

TIMP-2 обладает свойствами, присущими всем TIMPs ингибирующим MMPs, формируя нековалентные комплексы с активными ферментами. Помимо этого, известна роль семейства TIMP оказывать антиапоптотический эффект, тем самым способствовать росту и выживаемости тканеспецифичных клеток [12]. У TIMP-2 нокаут-мышей выявлен ряд патологий, заключающийся в нарушениях миогенеза скелетной мышечной ткани, формирования миотуб и миофибриллогенеза [13]. Поэтому, низкая доля ИПР в опытной группе, по сравнению с контрольной,

может быть связана с высоким содержанием TIMP-2, оказывающим гистопротекторный эффект в поврежденном миокарде. В связи с этим, не отрицается роль кардиомиогенеза на фоне низкой фибробластической активности, индуцированной аллогенным биоматериалом.

Установленная корреляция между изменением баланса протеолитической активности ММР-9/TIMP-2 и накоплением внеклеточного матрикса согласуется с данными других исследователей [14].

Известно, что металлопротеиназы и их ингибиторы секретируются клетками соединительной ткани, где ключевыми участниками являются, в том числе и макрофаги [15]. Поэтому, мы допускаем возможность взаимозависимости численности макрофагов с количеством ММР-9 — позитивных клеток. В настоящем исследовании обнаружено, что положительная корреляция ММР-9⁺ клеток и CD68 макрофагов согласуется со степенью выраженности рубца миокарда (ИПР в 2,7 раз выше в контрольной группе, чем в опытной). Макрофаги являются полиморфной клеточной популяцией, фенотип которых определяется сигналами микроокружения. В опытной группе после использования БМА продукты его биodeградации помимо антифиброгенного эффекта [4] создают определенное микроокружение [16], которое индуцирует выработку TIMP-2 воспалительными клетками.

Причем, макрофаги с фенотипом M2 секретируют металлопротеиназы [17], а биоматериал Аллоплант стимулирует миграцию M1-макрофагов с провоспалительной направленностью, являющихся антагонистами спектра противовоспалительных монокинов [18].

Заключение

Продукты резорбции аллогенного биоматериала Аллоплант влияют на баланс металлопротеиназ и их ингибиторов в ишемически поврежденном миокарде. Этот эффект способен оказать значительное влияние на процессы ремоделирования миокарда и формирование рубца.

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература

1. Foglia MJ, Poss KD. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. Development. 2016;143:729-40. doi:10.1242/dev.132910.
2. Toba H, Cannon PL, Yabluchanskiy A, et al. Transgenic overexpression of macrophage matrix metalloproteinase-9 exacerbates age-related cardiac hypertrophy, vessel rarefaction, inflammation, and fibrosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017;312(3):375-83. doi:10.1152/ajpheart.00633.2016.
3. Lebedeva AI, Muslimov SA, Musina LA. Experimental modeling of the process of chronic inflammation and fibrosis. Biomedicine. 2014;4:114-23. (In Russ.) Лебедева А.И., Муслимов С.А., Мусина Л.А. Экспериментальное моделирование процесса хронического воспаления и фиброза. Биомедицина. 2013;4:114-23.
4. Lebedeva AI. Spongiform biomaterial — inhibitor of fibrosis of damaged skeletal muscle. Russyskiy bioterapevticheskiy journal. 2014;4(13):37-44. (In Russ.) Лебедева А.И. Аллогенный губчатый биоматериал — ингибитор фиброза поврежденной скелетной мышечной ткани. Российский биотерапевтический журнал. 2014;4(13):37-44.
5. Guidance on laboratory animals and alternative models in biomedical research. Ed. Karkishchenko NN, Grachev SV. M.: Profile-2C. 2010: p.358. (In Russ.) Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2с. 2010: с. 358.
6. Gareev EM. A short review of the basic methods of mathematical and statistical processing of medical and biological information 2009. Ufa: Bashkortostan: p. 334. (In Russ.) Гареев Е.М. Краткий обзор базовых методов математико-статистической обработки медико-биологической информации 2009. Уфа: Башкортостан: с. 334.

7. Adamcova M, Potacova A, Popelova O, et al. Cardiac remodeling and MMPs on the model chronic daunorubicin — induced cardiomyopathy in rabbit. *Physiol. Res.* 2010;59:831-6.
8. Chiao YA, Ramirez TA, Zamilpa R, et al. Matrix metalloproteinase-9 deletion attenuates myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in ageing mice. *Cardiovasc Res.* 2012;96:444-55. doi:10.1093/cvr/cvs275.
9. LeBert DC, Squirrell JM, Rindy J, et al. Matrix metalloproteinase 9 modulates collagen matrices and wound repair. *Development.* 2015;142(12):2136-46. doi:10.1242/dev.121160.
10. Milyakova MN, Ponomarev YV, Gribkova OV, et al. Functional properties of macrophages during the interaction with implants for hernioplasty. *Modern problems of science and education.* 2016;3:1-9. (In Russ.) Миякова М.Н., Пономарева Ю.В., Грибкова О.В. и др. Функциональные особенности макрофагов при взаимодействии с имплантатами для герниопластики. *Современные проблемы науки и образования.* 2016;3:1-9. doi:10.17513/spno.24856.
11. Bahudhanapati H, Zhang Y, Sidhu SS, Brew KJ. Phage Display of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2): identification of selective inhibitors of collagenase-1 (metalloproteinase 1 (mmp-1)). *Biol Chem.* 2011;286(36):31761-70. doi:10.1074/jbc.M111.253328.
12. Lee EJ, Kim HS. The anti-inflammatory role of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lipopolysaccharide-stimulated microglia. *J Neuroinflammation.* 2014;11:116. doi:10.1186/1742-2094-11-116.
13. Lluri G, Langlois GD, Soloway PD, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates myogenesis and beta1 integrin expression in vitro. *Exp. Cell Res.* 2008;314:11-24. doi:10.1016/j.yexcr.2007.06.007.
14. Liu J, Khalil RA. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigational and therapeutic tools in unrestrained tissue remodeling and pathological disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;148:355-420. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.04.003.
15. Prutkin EV, Sepp AV, Tsybikov NN. Features of the synthesis of matrix metalloproteinase-9 in the lungs with the development of distress syndrome in the experiment. *Bulletin East-Siberian scientific centre of the Russian Academy of medical Sciences.* 2013;1(89):121-24. (In Russ.) Пругкина Е.В., Сепп А.В., Цыбиков Н.Н. Особенности синтеза матричной металлопротеиназы-9 в легких при развитии дистресс-синдрома в эксперименте. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.* 2013;1(89):121-4.
16. Lebedeva AI. Regulation of parenchymal-stromal relationship for the correction of defects of skeletal muscle allogenic biomaterial. *Experimental and clinical dermatocosmetology.* 2014;1:51-6. (In Russ.) Лебедева А.И. Регуляция паренхиматозно-стромальных взаимоотношений при коррекции дефектов скелетной мышцы аллогенным биоматериалом. *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология.* 2014;1:51-6.
17. Jager NA, de Vries BMW, Hillebrands JL, et al. Distribution of Matrix Metalloproteinases in Human Atherosclerotic Carotid Plaques and Their Production by Smooth Muscle Cells and Macrophage Subsets. *Mol Imaging Biol.* 2016;18:283-91. doi:10.1007/s11307-015-0882-0.
18. Lebedeva AI, Muslimov SA, Gareev EM, et al. Morphological features of macrophages and their cytokine profile in the regeneration of skeletal muscle plastic surgery allogenic spongy biomaterial. *Cytokines and inflammation.* 2015;14(1):27-33. (In Russ.) Лебедева А.И., Муслимов С.А., Гареев Е.М. и др. Морфологические особенности макрофагов и их цитокинового профиля в регенерации скелетной мышечной ткани при пластике аллогенным губчатым биоматериалом. *Цитокины и воспаление.* 2015;14(1):27-33.