

Дергилев К. В.¹, Цоколаева З. И.^{1,2}, Василец Ю. Д.¹,
Белоглазова И. Б.¹, Кульбицкий Б. Н.³, Парфенова Е. В.^{1,4}

¹ Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Москва, Россия

³ ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн № 3» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Москва, Россия

ГИПОКСИЯ КАК ВОЗМОЖНЫЙ РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ ЭПИКАРДИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МЕЗОТЕЛИЯ ПОСЛЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Цель	Изучить влияние гипоксии на активность эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в клетках эпикарда, способствующего образованию специализированного микроокружения.
Материал и методы	В работе использована модель экспериментального инфаркта миокарда, сформированная путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии. Исследование активности клеток эпикарда после гипоксического воздействия проведено с использованием маркера гипоксии пимонидазола, бромдезоксисуридина и иммунофлуоресцентных методов окрашивания криосрезов сердца, а также клеточной культуры мезотелия <i>in vitro</i> .
Результаты	Обнаружено, что в неповрежденном сердце поддерживаются покоящееся состояние клеток мезотелия, низкий уровень их пролиферации и продукции белков внеклеточного матрикса и активности ЭМП. Острое ишемическое повреждение обеспечивает развитие умеренной гипоксии в области эпикарда/субэпикарда, что вызывает ее глобальную перестройку, связанную с вступлением клеток в ЭМП, изменением клеточного состава и накоплением белков внеклеточного матрикса. Мы обнаружили, что результатом вхождения клеток мезотелия в ЭМП может быть образование предшественников гладкомышечных клеток и фибробластов, а также популяции кардиальных прогениторных клеток Sca-1+, которые могут как участвовать в построении новых сосудов, так и служить мезенхимальным звеном для паракринной поддержки клеток микроокружения. В экспериментах <i>in vitro</i> мы показали, что 72-часовая гипоксия способствует активации генов регуляторов ЭМП, вызывает разборку межклеточных контактов, разобщение клеток и увеличение их пластичности.
Заключение	Эпикард взрослого сердца служит неким «репаративным резервом», который способен реактивироваться под влиянием гипоксического воздействия. Это создает основу для разработки подхода для воздействия на эпикард, направленного на модуляцию его активности с целью регуляции репаративных процессов.
Ключевые слова	Клетки эпикарда; гипоксия; инфаркт миокарда; эпителиально-мезенхимальный переход; репарация сердца
Для цитирования	Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Vasilets Yu.D., Beloglazova I.B., Kulbitsky B.N., Parfyonova Ye.V. Hypoxia – as a Possible Regulator of the Activity of Epicardial Mesothelial Cells After Myocardial Infarction. <i>Kardiologiia</i> . 2021;61(6):59–68. [Russian: Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Василец Ю.Д., Белоглазова И.Б., Кульбицкий Б.Н., Парфенова Е.В. Гипоксия как возможный регулятор активности эпикардиальных клеток мезотелия после инфаркта миокарда. <i>Кардиология</i> . 2021;61(6):59–68]
Автор для переписки	Дергилев Константин Владимирович. E-mail: doctorokote@gmail.com

Введение

На протяжении нескольких десятков лет хроническая сердечная недостаточность (ХСН) сохраняет лидирующие позиции как важнейшая медико-социальная проблема современности [1]. Несмотря на широкую распространенность заболевания (2% в Западной Европе и США, 7% в России), ежегодный прогрессирующий рост числа заболевших и проведение крупных исследо-

ваний, полное понимание молекулярных и физиологических механизмов, лежащих в основе этого заболевания, так и не достигнуто. В связи с этим наблюдается повышенный интерес к изучению механизмов поддержания клеточного гомеостаза сердца и регуляции репаративной регенерации с целью поиска новых мишеней для предотвращения развития и прогрессирования ХСН [2–4]. Одной из таких мишеней является эпикард.

Эпикард – наружный, плотно примыкающий к миокарду слой стенки сердца, образованный клетками эпикардиального мезотелия, коллагеновыми и эластическими волокнами, который рассматривается с позиции важнейшего координатора физиологических/репаративных процессов в сердце [5]. В период эмбриогенеза клетки эпикарда вступают в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), что ведет к образованию прогениторных клеток, имеющих выраженный секреторный потенциал [6, 7], миграционные свойства и способность к дифференцировке с образованием гладкомышечных и эндотелиальных клеток коронарных сосудов, периваскулярных фибробластов, мезенхимальных клеток зачатков будущих клапанов сердца, интерстициальных фибробластов и части клеток эндокарда [8–11]. Нарушение функционирования клеток мезотелия приводит к серьезным дефектам развития миокарда, коронарных артерий, проводящей системы сердца и его клапанов [12–16]. Начиная со второй половины беременности, клетки эпикардиального мезотелия постепенно утрачивают способность к пролиферации, превращаются в слой покоящихся клеток эпикарда и остаются таковыми в постнатальном периоде [17]. Однако при остром ишемическом повреждении миокарда в клетках эпикарда частично реагируется эмбриональная программа экспрессии генов (*Wt1*, *Raldh2* и *Tbx18*) [18–20], что ведет к запуску пролиферации эпикардиальных клеток, которые вступают в ЭМП и участвуют в репарации [21, 22]. Регуляторами такой активации служат трансформирующий фактор роста бета, тромбоцитарный фактор роста, ретиноевая кислота, фактор роста фибробластов, сигнальные пути *Hippo/Yap*, *Sonic Hedgehog* и белки внеклеточного матрикса [23–32], которые в комбинации с гипоксией реализуют клеточный ответ на повреждение. Несмотря на наличие публикаций, подтверждающих участие гипоксии и факторов, индуцированных гипоксией (HIF) [33, 34], в регуляции активности ЭМП и дифференцировки клеток эмбрионального эпикарда, механизмы регуляции клеток постнатального эпикардиального мезотелия остаются малоизученными.

Мы предположили, что возникновение гипоксии в зоне эпикарда/субэпикарда после трансмурального инфаркта миокарда (ИМ) может служить стимулом для активации клеток эпикарда, связанной со вступлением в ЭМП, переключением на гликолитический тип энергетического обмена, изменением экспрессионного профиля и пролиферативной активности.

Цель

Изучение влияния гипоксии на активность ЭМП в клетках эпикарда, способствующего образованию специализированного микроокружения.

Материал и методы

Животные

В работе использовались самцы мышей линии C57BL/6 (возраст 12 нед) и крыс линии Wistar (возраст 13 нед), содержащиеся в питомнике лабораторных животных ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава России. Эксперименты одобрены этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ кардиологии» и выполнены в соответствии с действующими правилами, регламентирующими проведение экспериментов на лабораторных животных и условия их содержания [Хельсинкская декларация, 2000 г.; Приказ МЗ СССР №755 от 12.08.77 «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием «экспериментальных» животных»; Правила проведения качественных клинических испытаний в Российской Федерации (утверждены МЗ РФ 29.12.98)].

Моделирование ИМ и подготовка образцов

Экспериментальный ИМ моделировали путем лигирования передней нисходящей коронарной артерии по описанным ранее методикам [35]. Выведение животных из эксперимента (эвтаназия) проводили на 3, 5, 7 и 14-е сутки после моделирования ИМ, что отражало разные периоды репаративного процесса. В каждой группе, включая контрольную, ложно оперированную группу, было от 3 до 5 животных.

Оценка толщины эпикардиальной/субэпикардиальной области распределения производных клеток *Wt1*+ эпикарда и белков внеклеточного матрикса

Для исследования распределения клеток эпикарда и толщины субэпикардиальной области использовали криосрезы сердец, окрашенные гематоксилином и эозином. Криосрезы фиксировали в течение 20 мин в 96% этиловом спирте, затем промывали в дистиллированной воде и окрашивали гематоксилином в течение 5 мин. После окраски срезы промывали в проточной воде и дифференцировали в 1% солянокислом спирте с последующей отмывкой в проточной воде (10 раз по 5 мин). Затем срезы помещали на 5 мин в дистиллированную воду, окрашивали 1% водным раствором эозина в течение 1 мин. После окрашивания слайды промывали дистиллированной водой, обезвоживали и монтировали, используя среду на основе ксилола. Количественный анализ толщины субэпикарда проводили с использованием программного обеспечения Image J.

Для визуализации белков внеклеточного матрикса, клеток эпикарда *Wt1*+ и их производных использовали иммунофлуоресцентное окрашивание криосрезов стенки сердца. Замороженные криосрезы фиксировали

3,7% параформальдегидом (20 мин) или ледяным уксусом (в зависимости от спецификации антител) и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) в течение 5 мин. При оценке внутриклеточных маркеров дополнительно обрабатывали срезы 0,1% раствором Тритона X100 (5 мин). Для подавления неспецифического связывания антител срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10% сыворотки донора вторых антител в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркерам активированного эпикарда Wt1+ и фибулину, белкам внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген I, коллаген III), маркерам фибробластов (CD90, виментин), прогениторных клеток (SCA-1), эндотелиальных клеток (Pecam, фактор Виллебранда), гладкомышечных клеток (SMA, калпонин) в течение 1 ч, затем промывали в ФСБ и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488/594. Ядра клеток окрашивали DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Оценка пролиферативной активности клеток в зоне эпикарда/субэпикарда

Для оценки пролиферативной активности клеток эпикарда после ишемического повреждения был использован бромдезоксисуридин (БРДУ) – синтетический нуклеозид, аналог тимидина, который позволяет визуализировать пролиферирующие клетки при окрашивании срезов миокарда антителами к нему. БРДУ вводили внутривентриально (1 раз в сутки, 100 мг/кг массы животного, в течение 5 дней перед эвтаназией). Встраивание БРДУ в ДНК делящихся клеток (наличие его в ядрах клеток) определяли путем иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к БРДУ с вторичными антителами Alexa Fluor 488. Перед окрашиванием срезы стандартно фиксировали формалином и блокировали неспецифическое связывание антител раствором, содержащим 1% БСА, 10% сыворотки донора вторых антител в ФСБ (30 мин). Дополнительно срезы обрабатывали 2N соляной кислотой в течение 30 мин (37°C) для денатурации ДНК. Кислоту нейтрализовали 0,1M боратным буфером (2 раза по 5 мин). Активированные клетки эпикарда визуализировали с помощью антител к фибулину-5 и вторичных антител Alexa Fluor 488.

Оценка гипоксического профиля клеток в зоне эпикарда/субэпикарда

Для исследования гипоксического статуса клеток миокарда использовали пимонидазол, который входит в состав коммерческого набора Nuroxprobe™ Kit. Пимонидазол вводили внутривентриально (60 мг/кг массы животного) крысам линии Wistar за 2 ч до проведения эвтаназии. Инъекции пимонидазола выполняли интактным

животным, а также крысам после моделирования ИМ (через 5 и 14 дней после операции), по 3 животных в группе. После выведения животных из эксперимента сердца извлекали из грудной клетки, промывали ФСБ, затем погружали в кювету со средой для заморозки и замораживали в парах жидкого азота. Делали серийные срезы на криостате по 7 мкм с интервалом 250 мкм. Срезы сердца фиксировали формалином, промывали ФСБ, инкубировали в 1% растворе БСА с 10% сыворотки донора вторых антител 30 мин. Наносили на срезы антитела к пимонидазолу в разведении 1:100 и инкубировали при температуре 4°C в течение 8 ч. Отмывали срезы в растворе ФСБ 3 раза по 5 мин, затем окрашивали вторичными антителами Alexa Fluor 594.

Выделение клеток эпикарда мышцы и моделирование гипоксического воздействия

Для получения клеток эпикарда сердца мышат (возраст 2–3 дня) извлекали из грудной полости, промывали в растворе Кребса–Рингера с гепарином, переносили в 5 мл раствора трипсина (в расчете на 6 сердец) и инкубировали трижды по 5 мин при температуре 37°C в термошейкере Nubaid. После этого сердца извлекали, к полученной суспензии клеток добавляли 5 мл среды для инактивации фермента (среда IMDM, содержащая 20% фетальной сыворотки телят – ФСТ) и центрифугировали при 300g в течение 10 мин. Осадок ресуспензировали в среде IMDM для клеток эпикарда, содержащей 1% ФСТ, 10 мкМ ингибитора SB431542 и антибиотики, и переносили в чашки, покрытые желатином. Среду меняли каждые 2 сут. Для проведения экспериментов использовали клоны клеток эпикарда, полученные с помощью цилиндров для клонирования, имеющие подтвержденный иммунофенотип и морфологию. Для моделирования гипоксии использовали инкубатор New Brunswick™ Scientific. Культивирование клеток эпикарда в условиях 21% и 3% кислорода проводили в течение 24 и 72 ч.

Оценка морфологии и плотных контактов в клетках эпикарда, культивированных в условиях 21% и 3% кислорода

Морфологию клеток определяли с помощью фазово-контрастной микроскопии. Плотные контакты в клетках эпикарда, культивированных в условиях 21% и 3% кислорода, исследовали с помощью иммуноцитохимии. Клетки пермеабелизировали 0,1% раствором Тритона X-100 (5 мин) и окрашивали антителами к маркеру ZO-1 в течение 1 ч. Затем клетки промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1:800, в течение 60 мин при температуре 37°C). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI.

Микроскопия и анализ изображений

Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 M и программного обеспечения AxioVision 4.7.

Подготовка образцов и полимеразная цепная реакция в реальном времени

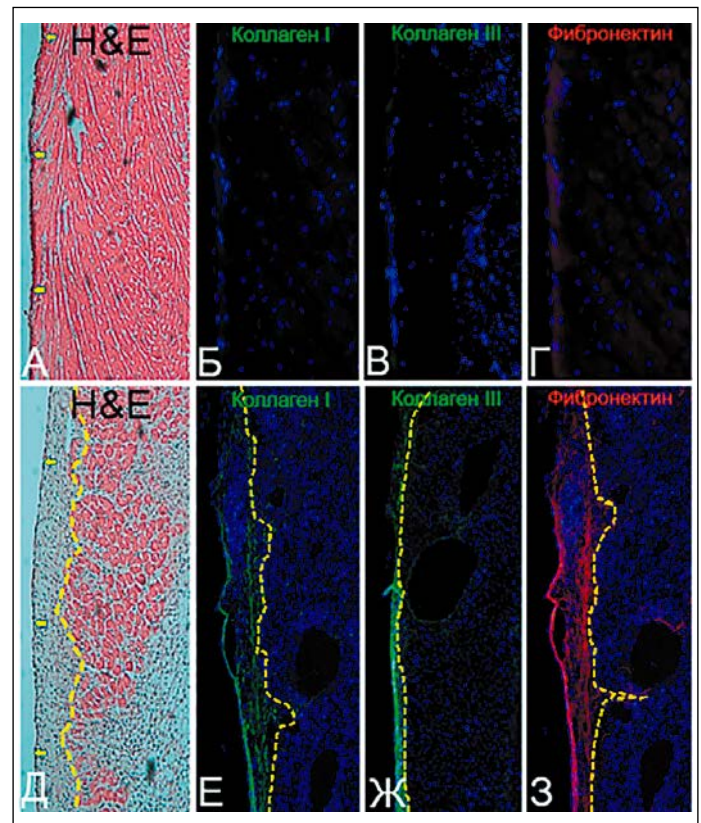
Рибонуклеиновые кислоты выделяли из клеток с помощью набора Qiagen. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени выполняли на амплификаторе Step One Plus Real-Time PCR System по стандартному протоколу с использованием следующих праймеров: SNAI1 (for: ACATCCGAAGCCACACG; rev: GTCAGCAAAAGCACGGTTG), SNAI2 (for: ACACATAGAACTCACACTGGG; rev: TGGAGAAGGTTTGGAGCAG), Wt1 (for: AGCACGGTCACTTTCGACG; rev: GTTGAAGGAATGGTTGGGGAA), Ly6a (Sca-1) (for: GAGGCAGCAGTATTGTGGAT; rev: CGTTGACCTTAGTACCCAGGA).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 8.0. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Сравнение данных проводилось с помощью критерия U Манна-Уитни и критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Ключевым патофизиологическим компонентом ИМ является гипоксия, которая активирует сигнальный путь HIF [36] и запускает широкий спектр клеточных реакций, включая регуляцию экспрессии генов и посттрансляционные модификации белков. Для изучения влияния тканевой гипоксии на активность клеток эпикарда были исследованы срезы сердец животных, полученных после моделирования ИМ. Сравнительный гистологический анализ срезов неповрежденных сердец крысы и сердец после экспериментального ИМ показал существенные различия в организации эпикардального микроокружения. В неповрежденном сердце эпикард представляет собой тонкий слой, образованный 2–4 слоями клеток (рис. 1, А–Г), который расположен на базальной мембране, состоящей из белков внеклеточного матрикса. При остром ишемическом повреждении сердца происходит 8–12-кратное увеличение толщины эпикардальной области, которая структурно разделяется на 2 части: эпикард с высокой плотностью клеток и субэпикард с более низким уровнем компактизации (рис. 1, Д). После ИМ в субэпикарде визуализируется значительное количество белков межклеточного матрикса, коллагена I, III типов

Рисунок 1. Репрезентативные изображения гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания срезов интактного/неповрежденного сердца (А–Г) и через 7 дней (Д–З) после моделирования инфаркта миокарда. Фотографии ткани сердца



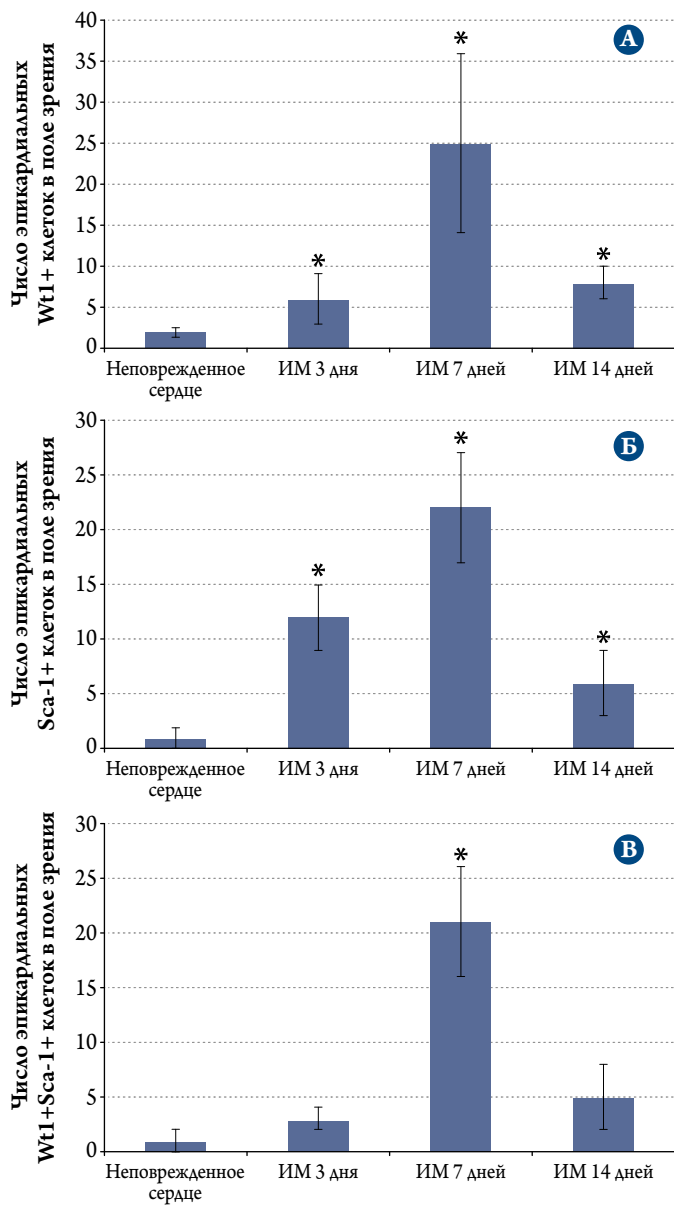
А, Д – окраска гематоксилином и эозином; окраска антителами на коллаген I (Б, Е – зеленый), коллаген III (В, Ж – зеленый); фибронектин (Г, З – красный). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Желтыми стрелками отмечена линия эпикарда. Желтая пунктирная линия отделяет зону эпикарда/субэпикарда от мышечной ткани.

и фибронектина (рис. 1, Е–З), что может быть следствием активации ЭМП в клетках эпикарда с образованием мезенхимных производных, активно продуцирующих белки внеклеточного матрикса.

Окрашивание срезов сердца антителами к маркеру активированного эпикарда Wt1+ показало, что в составе эпикарда и субэпикарда после ИМ формируются клетки, экспрессирующие данный транскрипционный фактор. Наибольшее количество таких клеток образовывалось на 7–14-й день после ИМ (рис. 2). В эпикарде неповрежденного сердца (рис. 2, А) клетки Wt1+ не обнаруживаются, что позволяет считать их появление одним из важных признаков активации эпикарда.

Для оценки связи активации клеток эпикарда и уровня гипоксии в области эпикарда/субэпикарда были проведены эксперименты с использованием пимонидазола [37], который вводили внутривенно крысам контрольной группы и после моделирования ИМ. Пимонидазол метаболизируется клетками, находящими-

Рисунок 2. Графики количественной оценки клеток эпикарда, экспрессирующих Wt1+ и Sca-1+, в неповрежденном сердце и на разных сроках после ИМ (на 3, 7 и 14-е сутки): число клеток в поле зрения в зоне эпикарда/субэпикарда

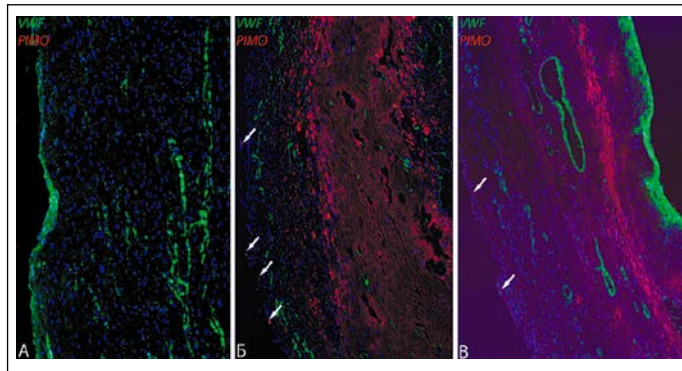


А – клетки Wt1+; Б – клетки Sca1+; В – клетки Wt1+Sca1+; ИМ – инфаркт миокарда.

ся в состоянии гипоксии, и его метаболиты могут быть идентифицированы с помощью специфических антител (рис. 3) [38, 39].

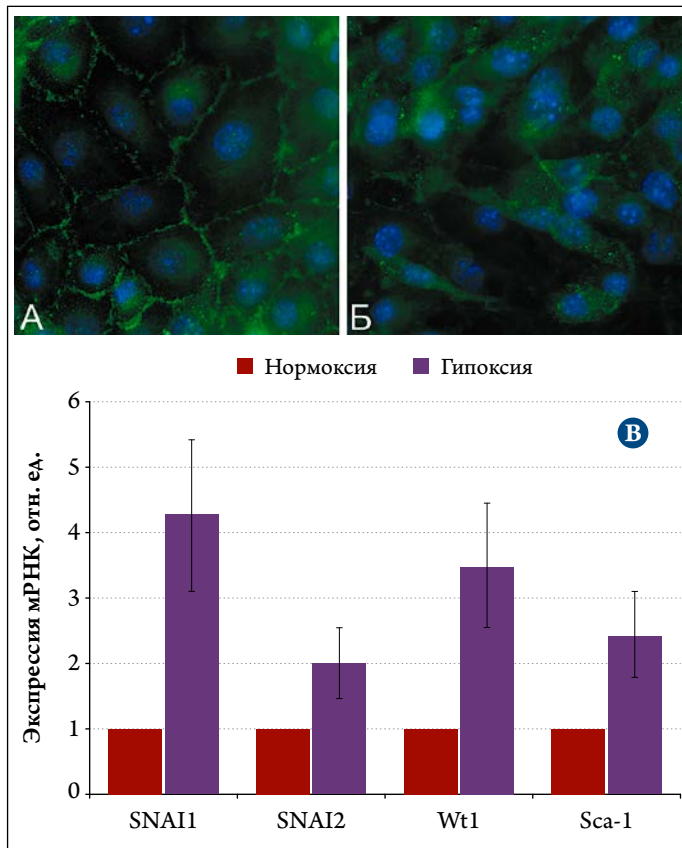
Гистологический анализ показал, что специфическое окрашивание на метаболиты пимонидазола имеется только в образцах, взятых у животных с ИМ, локализуется преимущественно в зоне миокарда и лишь в единичных клетках – в эпикардиальной области. Следует отметить, что по сравнению с 5-м днем после ИМ, к 14-му дню область позитивного окрашивания на метаболиты пимонидазола смещается от эпикарда вглубь стенки сердца (рис. 3). Учитывая, что использование пимонидазола позволяет реги-

Рисунок 3. Репрезентативные изображения распределения сосудов и метаболитов пимонидазола на срезах неповрежденного миокарда (А) крысы и после инфаркта миокарда (указано стрелками) на 5-й (Б) и 14-й (В) дни



Представлены репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания сосудов (фактор Виллебранда – зеленый) и метаболитов пимонидазола (красный) в стенке сердца.

Рисунок 4. Изменение межклеточных контактов и экспрессионного профиля в клетках эпикарда после гипоксического воздействия



Представлены репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания клеток эпикарда на маркер плотных межклеточных контактов (ZO1 – зеленый) после культивирования в условиях нормоксии (А) и гипоксии (Б); В – график оценки экспрессии генов-регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода в клетках эпикарда после культивирования в условиях нормоксии (красные столбцы) и гипоксии (3% O₂; фиолетовые столбцы). Уровень экспрессии генов в клетках, культивированных в условиях нормоксии, принят за единицу.

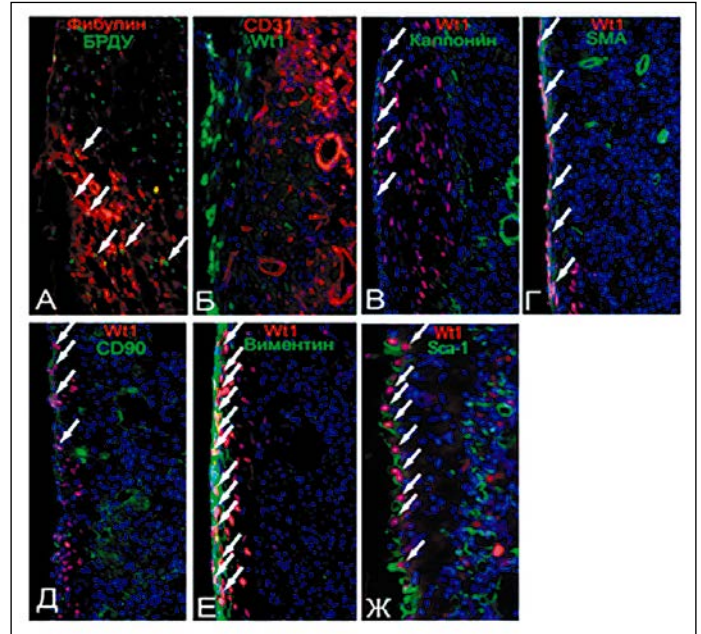
стрировать метаболическую активность клеток, находящихся в условиях высокой степени гипоксии при $<1\% \text{ O}_2$, можно предположить, что при возникновении трансмурального ИМ жесткая гипоксия развивается лишь в небольшой части клеток, а преимущественное большинство существует в зоне умеренной недостаточности кислорода.

Для подтверждения участия гипоксии в регуляции активности эпикарда были проведены эксперименты *in vitro* путем моделирования умеренной гипоксии – $3\% \text{ O}_2$ (рис. 4). Показано, что культивирование клеток эпикарда в течение суток в гипоксических условиях не сопровождалось повышением экспрессии генов-регуляторов ЭМП (*SNAI1*, *SNAI2*, *Wt1*). При более длительном (72 ч) культивировании в гипоксической среде наблюдалось изменение морфологии клеток эпикарда, что проявлялось в потере «кубовидной» формы, разрушении ZO1+ межклеточных контактов и приобретении фибробластоподобного фенотипа. Обнаруженные изменения сочетались с повышением экспрессии генов-регуляторов ЭМП и *Luca* (*Sca-1*), что указывает на признаки эпителиально-мезенхимальной трансформации.

Учитывая выявленное увеличение экспрессии генов ЭМП, повышение числа клеток *Wt1+* и значительное утолщение субэпикардиальной области после ишемического повреждения, мы провели исследование пролиферативной активности клеток эпикарда. Известно, что в период эмбриогенеза активация эпикарда сопровождается усилением пролиферативной активности его клеток [40]. Для оценки уровня пролиферации клеток эпикарда и визуализации пролиферирующих клеток использовали БРДУ. Было установлено, что через 5 дней после ИМ в области эпикарда/субэпикарда происходит 8-кратное увеличение числа пролиферирующих клеток по сравнению с их числом в неповрежденном сердце (5 ± 2 и 40 ± 12 клеток в поле зрения соответственно). В дальнейшем рост числа пролиферирующих клеток продолжался и достигал 102 ± 16 БРДУ+ клеток в поле зрения, что соответствует динамике увеличения толщины субэпикардиальной области после ИМ. Мы показали, что новообразованное субэпикардиальное микроокружение после ИМ включает не только белки внеклеточного матрикса (коллагены и фибронектин), но и различные типы клеток. Было обнаружено значительное накопление в этой области клеток активированного эпикарда, а также его производных – клеток *Wt1+* с маркерами гладкомышечных клеток и фибробластов (рис. 5).

Наряду с этим мы обнаружили аккумуляцию в области субэпикарда клеток *Wt1+*, коэкспрессирующих маркер кардиальных прогениторных клеток *Sca-1* [41, 42] (см. рис. 2, Б, В; см. рис. 5, Ж), что может указывать на эпикардиальное происхождение этих клеток путем вступления в ЭМП. В неповрежденной субэпикарди-

Рисунок 5. Репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания срезов сердца крысы на 7-й день после моделирования инфаркта миокарда антителами к маркерам клеток эпикардиального мезотелия и сосудистых клеток-предшественниц



А – окрашивание антителами к маркеру активированных клеток эпикарда – фибулину (красный) и БРДУ (зеленый, ядерное окрашивание); Б – окрашивание антителами на *Wt1* (зеленый) и Pecam1 (эндотелиальные клетки, красный); В – окрашивание антителами на *Wt1* (красный) и калпонин (зеленый); Г – окрашивание антителами на *Wt1* (красный) и SMA (зеленый); Д – окрашивание антителами на *Wt1* (красный) и CD90 (зеленый); Е – окрашивание антителами на *Wt1* (красный) и виментин (зеленый); Ж – окрашивание антителами на *Wt1* (красный) и *Sca-1* (зеленый). Стрелки указывают на колокализацию сигналов красителей.

альной области определяются единичные клетки *Sca-1+* в поле зрения, при этом их количество значительно возросло после ИМ (на 3-й день – 12 ± 3 клетки в поле зрения, на 7-й день – 22 ± 5 клеток в поле зрения)

Обсуждение

Приведенные данные указывают, что низкое напряжение кислорода (гипоксия) в сердце является важным фактором, участвующим в ремоделировании эпикардиального микроокружения после ИМ. В неповрежденном сердце поддерживаются покоящееся состояние клеток мезотелия, низкий уровень их пролиферации, способности к продукции белков внеклеточного матрикса и активности ЭМП. И напротив, острое ишемическое повреждение вызывает глобальную перестройку эпикардиальной области и изменение клеточного состава. В экспериментах *in vitro* мы показали, что 72-часовая гипоксия способствует активации генов регуляторов ЭМП, вызывает разборку межклеточных контактов, разобщение клеток и увеличение их пластичности. Мы обнаружили, что результатом вхождения клеток мезоте-

**ФОРСИГА® — ЕДИНСТВЕННЫЙ
ЖИЗНЕСПАСАЮЩИЙ ПРЕПАРАТ
ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С ХСНФВ
БЕЗ ТИТРАЦИИ^{1-3, #}**

↓ 26%

Снижает риск
СС смерти
и госпитализаций
по поводу СН*³

**ВКЛЮЧЕН
В РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ХСН²**

**1 таблетка
10 мг¹**

**1 раз
в сутки¹**

**без
титрации¹**

**включен в ЖНВЛП⁴
и ОНЛС⁵**

КРАТКАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ФОРСИГА®; РЕГИСТРАЦИОННЫЙ НОМЕР: ПП-002596. ТОРГОВОЕ НАЗВАНИЕ: ФОРСИГА® (ФОРСИГА®). МЕЖДУНАРОДНОЕ НЕПАТЕНТОВАННОЕ НАЗВАНИЕ: ДАПАГЛИФЛОЗИН. ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА: таблетки, покрытые пленочной оболочкой. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ: САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА. Взрослым пациентам в дополнение к диете и физическим упражнениям для улучшения гликемического контроля в качестве монотерапии, когда применение метформина недостаточно, комбинированной терапии с метформин, производными сульфонилмочевины (в том числе, в комбинации с метформин), инсулином, диетическими препаратами (показано/одобренными полипептидами) (ПП-1) (в том числе, в комбинации с метформин), производными сульфонилмочевины (в том числе, в комбинации с метформин) и/или инсулином (в том числе, в комбинации с метформин) для перорального применения при отсутствии адекватного гликемического контроля на данной терапии, стартовой комбинированной терапии с метформин, при целесообразности данной терапии. Сахарный диабет 2 типа у взрослых пациентов с установленным диагнозом сердечно-сосудистого заболевания или двумя и более факторами сердечно-сосудистого риска (возраст у мужчин ≥ 55 лет или ≥ 60 лет у женщин и наличие не менее одного фактора риска, дислипидемия, артериальная гипертензия, курение) для снижения риска госпитализации по поводу сердечной недостаточности. **СЕРДЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ (H-FУ функциональный класс по классификации NYHA) со сниженной фракцией выброса у взрослых пациентов для снижения риска сердечно-сосудистой смерти и госпитализации по поводу сердечной недостаточности. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ:** повышенная индивидуальная чувствительность к любому компоненту препарата; сахарный диабет 1-го типа; диабетический кетоацидоз; нарушение функции почек при расчетной СКФ (СКФ) стабильно менее 60 мл/мин/1,73 м², включая нарушение функции почек тяжелой степени и терминальную стадию почечной недостаточности, при применении по показаниям сахарный диабет 2 типа; нарушение функции почек тяжелой степени и терминальная стадия почечной недостаточности (рСКФ < 30 мл/мин/1,73 м²), при применении по показаниям сердечная недостаточность в связи с органическим опытом применения в клинических исследованиях; последственная лактоз, дефицит лактазы или глюкозо-галактозная мальабсорбция; беременность и период грудного вскармливания; детский возраст до 18 лет (безопасность и эффективность не изучены). **ОСТОРОЖНОСТЬ:** печеночная недостаточность тяжелой степени, инфекции мочевыводящих путей, мочевыводящих путей, инфекции мочевыводящих путей, инфекции мочевыводящих путей, инфекции мочевыводящих путей. **ПРИМЕНЕНИЕ В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ И ГРУДНОГО ВСКРМЛИВАНИЯ** В связи с тем, что применение дапаглифлозина в период беременности не изучено, препарат противопоказан в период беременности. В случае диагностирования беременности терапия дапаглифлозином должна быть прекращена. Независимо, применяли ли дапаглифлозин или его неактивные метаболиты в грудное молоко. Нельзя исключать риск для новорожденных/лактации. Дапаглифлозин противопоказан в период грудного вскармливания. **СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ И ДОЗЫ:** Внутрь, независимо от приема пищи, не разжевывая. Сахарный диабет 2 типа. Монотерапия: рекомендуемая доза препарата Форсига составляет 10 мг один раз в сутки. Комбинированная терапия: рекомендуемая доза препарата Форсига составляет 10 мг один раз в сутки. **ПОВЫШЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ:** Полный обзор профиля безопасности. В клинических исследованиях СД2 более 15000 пациентов получали терапию дапаглифлозином. Первичная оценка безопасности и переносимости проводилась в зарекомендованном анализе объединенных данных 13 краткосрочных (до 24 недель) плацебо-контролируемых исследований, в которых 2360 пациентов принимали дапаглифлозин в дозе 10 мг и 2295 пациентов получали плацебо. В исследовании дапаглифлозина в отношении сердечно-сосудистых исходов при СД2 (DECLARE) 8574 пациента получали дапаглифлозин 10 мг и 8569 получили плацебо (медиаана воздействия 48 месяцев). В общей сложности экспозиция дапаглифлозина составила 30623 пациенто-лет. В исследовании дапаглифлозина в отношении сердечно-сосудистых исходов у пациентов с сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса (DAPA-HF) 2368 пациентов получали дапаглифлозин 10 мг и 2368 получали плацебо (медиаана воздействия 18 месяцев). Получения включала пациентов с СД2 и без него, и пациентов с рСКФ ≥ 30 мл/мин/1,73 м². Профиль безопасности дапаглифлозина в исследовании был в целом схожим по изучаемым показателям. Повлечу гипотонемии и диабетической кетоацидоза отмечали только у пациентов с сахарным диабетом. Ниже представлены НР, отмечавшиеся в плацебо-контролируемых клинических исследованиях и при постмаркетинговом применении. На одну из них не заведено от дозы препарата. НР классифицированы по частоте и тяжести по системе и органам. Частота НР представлена в виде следующей градации: очень часто ($\geq 1/100$), часто ($\geq 1/1000$, $< 1/100$), нечасто ($\geq 1/10000$, $< 1/1000$), очень редко ($< 1/10000$) и частотность частоты (невозможно оценить по полученным данным). Инфекционные и паразитарные заболевания: часто — вульвовагинит, баланит и связанные с ними генитальные инфекции, инфекции мочевыводящих путей; нечасто — вирусный/вагинальный зуд, трихомонадные инфекции; очень редко — некротизирующий фасциит промежности (гангрена Фурье). Нарушения со стороны обмена веществ и питания: очень часто — гипогликемия (при применении в комбинации с производными сульфонилмочевины или инсулином); нечасто — снижение QКГ, жажда, редко — диабетический кетоацидоз (при применении при СД2). Нарушения со стороны нервной системы: часто — головкружение. Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта: нечасто — запор, сухость во рту. Нарушения со стороны кожи и подкожных тканей: часто — сыпь; очень редко — ангионевротический отек. Нарушения со стороны костно-мышечной системы и соединительной ткани: часто — боль в спине. Нарушения со стороны почек и мочевыводящих путей: часто — диурез, полиурия; нечасто — нектрия. Лабораторные и инструментальные данные: часто — дислипидемия, повышение значения гемоглобина, снижение почечного клиренса креатинина на начальном этапе терапии; нечасто — повышение концентрации мочевины в крови, повышение концентрации креатинина в крови на начальном этапе терапии.

Ссылка на полную инструкцию: Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Форсига® (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг, 10 мг). Регистрационное удостоверение ПП-002596 от 21.08.2014

ХСНФВ — хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса; СС — сердечно-сосудистый; СН — сердечная недостаточность.

¹ Включая нежелательные события по причине СН. ² Снижение относительного риска сердечно-сосудистой смерти и смерти от всех причин в группе дапаглифлозина по сравнению с плацебо в исследовании DAPA-HF.

³ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Форсига® (таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг, 10 мг). Регистрационное удостоверение ПП-002596 от 21.08.2014.

⁴ Клинические рекомендации Хроническая сердечная недостаточность 2020. https://scsifo.ru/content/Guidelines/2020/01nic_rekom_HSN.pdf (дата обращения 04.05.2021).

⁵ McMurtry JV et al., N Engl J Med. 2019;381(21):1995-2008.

4. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения.

5. Перечень лекарств для обеспечения отдельных граждан.

Материал предназначен для специалистов здравоохранения. Имеются противопоказания. Перед назначением ознакомьтесь, пожалуйста, с полной инструкцией по медицинскому применению лекарственного препарата.

ООО «АстраЗенка Фармацевтикалс» 123112, Москва, 1-й Красногвардейский проезд, д.21, стр.1, 30 этаж Бизнес-центр «ЮКО». Тел.: +7 (495) 799-56-99, факс: +7 (495) 799-56-98 www.astrazeneca.ru
FOR-RI-10248. Дата одобрения: 05.05.2021. Дата истечения: 04.05.2023.

лия в ЭМП может быть образование предшественников гладкомышечных клеток и фибробластов, а также популяции кардиальных прогениторных клеток Sca-1+, которые могут как участвовать в построении новых сосудов, так и служить мезенхимальным звеном для паракриной поддержки клеток микроокружения [43, 44]. Удивительной находкой было обнаружение накопления белков внеклеточного матрикса в эпикардальном/субэпикардальном пространстве, что организует уникальные условия для эпикардальных клеток-производных, обеспечивая изоляцию от нижележащей ткани и воспалительных клеток. Вместе с тем при развитии трансмурального ИМ область эпикарда не подвергается тяжелому гипоксическому воздействию. Можно предположить, что в определенной степени тканепротективное действие на эпикард оказывает перикардальная жидкость, являющаяся ультрафильтратом плазмы и содержащая большое количество различных белковых факторов и растворенный кислород. Ранее было показано, что у пациентов с тампонадой сердца давление кислорода в перикардальной жидкости было ниже, чем в венозном русле, но достигало в среднем 14 мм рт. ст., варьируя от 5 до 24 мм рт. ст. [45]. В другом исследовании у собак с перикардальным экссудатом давление кислорода в перикардальной жидкости и в вене не различалось и составляло около 35 мм рт. ст. [46]. Эти показатели были выше, чем в гипоксических условиях – 7 мм рт. ст., 1% O₂. Эти данные позволяют предположить, что относительно высокая концентрация кислорода сохраняется в перикардальной жидкости и при ИМ, учитывая, что кровоснабжение перикарда в отличие от эпикарда и миокарда идет за счет перикардо-диафрагмальной артерии и перикардальных ветвей грудной аорты. Диффузия кислорода из перикардальной жидкости в эпикард/субэпикард может препятствовать развитию в нем тяжелых гипоксических условий, и тем самым в определенной степени защищать данную зону от повреждения и обеспечивать сохранность регенеративного потенциала эпикардальной клеточной ниши. Формирование зоны умеренной гипоксии (2–3%) в зоне эпикарда способствует перестройке эпикардального микроокружения. Результаты многочисленных работ показывают, что гипоксия может контролировать клеточное микроокружение путем активации сигнального пути HIF (фактора, индуцируемого гипоксией) [47]. В нормоксических условиях ферменты пролилгидроксилазы 1, 2 и 3-го типов (PHD1/2/3) и белок Гиппель–Линдау (Von Hippel – Lindau) осуществляют комплексное воздействие на факторы HIF-1 и HIF-2, вызывая их протеасомную деградацию [48]. В условиях гипоксии HIF-1 и HIF-2 стабилизируются и координируют клеточный ответ на гипоксию, активируя программы экспрессии

генов для клеточной адаптации в условиях кислородной недостаточности [48]. Это достигается за счет опосредованной HIF модуляции ЭМП путем повышения секреции TGFβ и активации факторов транскрипции SNAIL1, SNAIL2, TWIST, SIP1 и ZEB1. Такой механизм регуляции активности ЭМП был продемонстрирован на разных клеточных линиях после гипоксического воздействия или конститутивной экспрессии фактора HIF. Возможно, именно ЭМП, индуцируемый HIF, является механизмом формирования эпикардальной «клеточной ниши», образуя исходную стволовую/прогениторную клетку Sca-1+, которая преимущественно использует цитоплазматический гликолиз и противостоит гипоксическому стрессу. Вместе с тем гипоксическое воздействие способствует активации эпикардального пула клеток, образованию эпикардальных клеток-предшественниц, обеспечивая гетерогенность клеточного состава микроокружения. Вероятно, это необходимо для обеспечения зоны повреждения клетками разных типов для быстрого формирования рубцовой ткани и сосудов de novo [49], а также разнонаправленных паракриных репаративных сигналов. Ярким примером такой регуляции может служить фоллистатинподобный белок (Fstl-1), который секретируется клетками эпикарда [50]. Продукция Fstl-1 сохраняется на высоком уровне в эмбриональном сердце, но практически полностью исчезает во взрослом органе. Однако в ответ на острое ишемическое повреждение активированные клетки миокарда начинают вновь продуцировать этот белок [51], что обеспечивает повышение выживаемости кардиомиоцитов в зоне ишемии, стимуляцию их вступления в клеточный цикл, активацию ангиогенеза и другие кардиопротективные эффекты.

Заключение

Таким образом, эпикард взрослого сердца служит неким резервным «клеточным депо», которое способно реактивировать свой репаративный потенциал под влиянием гипоксического воздействия. Это создает основу для разработки подходов таргетного воздействия на эпикард, направленного на модуляцию его активности с целью регуляции репаративных процессов.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-15-00384) и РФФИ (грант № 19-015-00231, гистологические и морфометрические исследования Sca-1+ клеток, оценка экспрессии гена Луба (Sca-1) методом ПЦР в реальном времени).

Конфликт интересов не заявлен.

Статья поступила 30.11.2020

- Bueno H, Moura B, Lancellotti P, Bauersachs J. The year in cardiovascular medicine 2020: heart failure and cardiomyopathies. *European Heart Journal*. 2021;42(6):657–70. DOI: 10.1093/eurheartj/ehaa1061
- Lafuse WP, Wozniak DJ, Rajaram MVS. Role of Cardiac Macrophages on Cardiac Inflammation, Fibrosis and Tissue Repair. *Cells*. 2020;10(1):51. DOI: 10.3390/cells10010051
- Dergilev K.V., Vasilets Yu.D., Tsokolaeva Z.I., Zubkova E.S., Parfenova E.V. Perspectives of cell therapy for myocardial infarction and heart failure based on cardiosphere cells. *Therapeutic Archive*. 2020;92(4):111–20. [Russian: Дергилев К.В., Василец Ю.Д., Цоколаева З.И., Зубкова Е.С., Парфенова Е.В. Перспективы клеточной терапии инфаркта миокарда и сердечной недостаточности на основе клеток кардиосфер. *Терапевтический Архив*. 2020;92(4):111–20]. DOI: 10.26442/00403660.2020.04.000634
- Dergilev KV, Shevchenko EK, Tsokolaeva ZI, Beloglazova IB, Zubkova ES, Boldyreva MA et al. Cell Sheet Comprised of Mesenchymal Stromal Cells Overexpressing Stem Cell Factor Promotes Epicardial Activation and Heart Function Improvement in a Rat Model of Myocardium Infarction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9603. DOI: 10.3390/ijms21249603
- Dergilev K.V., Komova A.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Parfenova E.V. Epicardium as a new target for regenerative technologies in cardiology. *Genes and cells*. 2020;15(2):33–40. [Russian: Дергилев К.В., Комова А.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В. Эпикард как новая мишень для регенеративных технологий в кардиологии. *Гены и клетки*. 2020;15(2):33–40]. DOI: 10.23868/202004016
- Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MTM, Rudat C, Kispert A. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature*. 2009;458(7240):E8–9. DOI: 10.1038/nature07916
- Rudat C, Kispert A. Wt1 and Epicardial Fate Mapping. *Circulation Research*. 2012;111(2):165–9. DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.112.273946
- Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial Mesoderm Generates a Population of Coronary Smooth Muscle Cells Migrating into the Heart along with Ingrowth of the Epicardial Organ. *Developmental Biology*. 1996;174(2):221–32. DOI: 10.1006/dbio.1996.0068
- Dettman RW, Denetclaw W, Ordahl CP, Bristow J. Common Epicardial Origin of Coronary Vascular Smooth Muscle, Perivascular Fibroblasts, and Intermycardial Fibroblasts in the Avian Heart. *Developmental Biology*. 1998;193(2):169–81. DOI: 10.1006/dbio.1997.8801
- Männer J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *The Anatomical Record*. 1999;255(2):212–26. PMID: 10359522
- Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters M-PFM, Mentink MMT, Gourdie RG, Poelmann RE. Epicardium-Derived Cells Contribute a Novel Population to the Myocardial Wall and the Atrioventricular Cushions. *Circulation Research*. 1998;82(10):1043–52. DOI: 10.1161/01.RES.82.10.1043
- Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters M-PFM, Bergwerff M, Mentink MMT, Poelmann RE. Epicardial Outgrowth Inhibition Leads to Compensatory Mesothelial Outflow Tract Collar and Abnormal Cardiac Septation and Coronary Formation. *Circulation Research*. 2000;87(11):969–71. DOI: 10.1161/01.RES.87.11.969
- Pérez-Pomares J-M, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wesels A, Muñoz-Chápuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *The International Journal of Developmental Biology*. 2002;46(8):1005–13. PMID: 12533024
- Poelmann RE, Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC. The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Texas Heart Institute Journal*. 2002;29(4):255–61. PMID: 12484609
- Rothenberg F, Hitomi M, Fisher SA, Watanabe M. Initiation of apoptosis in the developing avian outflow tract myocardium. *Developmental Dynamics*. 2002;223(4):469–82. DOI: 10.1002/dvdy.10077
- Schaefer KS, Doughman YQ, Fisher SA, Watanabe M. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Developmental Dynamics*. 2004;229(3):489–99. DOI: 10.1002/dvdy.10463
- Chen TH-P, Chang T-C, Kang J-O, Choudhary B, Makita T, Tran CM et al. Epicardial Induction of Fetal Cardiomyocyte Proliferation via a Retinoic Acid-Inducible Trophic Factor. *Developmental Biology*. 2002;250(1):198–207. DOI: 10.1006/dbio.2002.0796
- Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh J-H, Butterfield C et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(5):1894–904. DOI: 10.1172/JCI45529
- Limana F, Bertolami C, Mangoni A, Di Carlo A, Avitabile D, Mocini D et al. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit+ cells: Role of the pericardial fluid. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2010;48(4):609–18. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.008
- Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012;485(7400):593–8. DOI: 10.1038/nature11044
- von Gise A, Pu WT. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circulation Research*. 2012;110(12):1628–45. DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.111.259960
- Smits A, Riley P. Epicardium-Derived Heart Repair. *Journal of Developmental Biology*. 2014;2(2):84–100. DOI: 10.3390/jdb2020084
- Missinato MA, Tobita K, Romano N, Carroll JA, Tsang M. Extracellular component hyaluronic acid and its receptor Hmhr are required for epicardial EMT during heart regeneration. *Cardiovascular Research*. 2015;107(4):487–98. DOI: 10.1093/cvr/cvv190
- Singh A, Ramesh S, Cibi DM, Yun LS, Li J, Li L et al. Hippo Signaling Mediators Yap and Taz Are Required in the Epicardium for Coronary Vasculature Development. *Cell Reports*. 2016;15(7):1384–93. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.027
- Wada AM, Smith TK, Osler ME, Reese DE, Bader DM. Epicardial/Mesothelial Cell Line Retains Vasculogenic Potential of Embryonic Epicardium. *Circulation Research*. 2003;92(5):525–31. DOI: 10.1161/01.RES.0000060484.11032.0B
- Lu J, Landerholm TE, Wei JS, Dong X-R, Wu S-P, Liu X et al. Coronary Smooth Muscle Differentiation from Proepicardial Cells Requires RhoA-Mediated Actin Reorganization and p160 Rho-Kinase Activity. *Developmental Biology*. 2001;240(2):404–18. DOI: 10.1006/dbio.2001.0403
- Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X et al. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2005;102(51):18455–60. DOI: 10.1073/pnas.0504343102
- Lavine KJ, White AC, Park C, Smith CS, Choi K, Long F et al. Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes & Development*. 2006;20(12):1651–66. DOI: 10.1101/gad.1411406
- Morabito CJ, Dettman RW, Kattan J, Collier JM, Bristow J. Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Developmental Biology*. 2001;234(1):204–15. DOI: 10.1006/dbio.2001.0254
- Vega-Hernandez M, Kovacs A, De Langhe S, Ornitz DM. FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Development*. 2011;138(15):3331–40. DOI: 10.1242/dev.064410
- Zamora M, Manner J, Ruiz-Lozano P. Epicardium-derived progenitor cells require -catenin for coronary artery formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007;104(46):18109–14. DOI: 10.1073/pnas.0702415104
- Austin AF, Compton LA, Love JD, Brown CB, Barnett JV. Primary and immortalized mouse epicardial cells undergo differentiation in response to TGFβ. *Developmental Dynamics*. 2008;237(2):366–76. DOI: 10.1002/dvdy.21421

33. Tao J, Barnett J, Watanabe M, Ramirez-Bergeron D. Hypoxia Supports Epicardial Cell Differentiation in Vascular Smooth Muscle Cells through the Activation of the TGF β Pathway. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2018;5(2):19. DOI: 10.3390/jcdd5020019
34. Tao J, Doughman Y, Yang K, Ramirez-Bergeron D, Watanabe M. Epicardial HIF signaling regulates vascular precursor cell invasion into the myocardium. *Developmental Biology*. 2013;376(2):136–49. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.01.026
35. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Molokotina Yu.D., Parfenova E.V. Characteristics of angiogenic properties of c-Kit+ cells of the myocardium. *Genes and Cells*. 2018;13(3):82–8. [Russian: Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Молокотина Ю.Д., Парфенова Е.В. Характеристики ангиогенных свойств c-Kit+-клеток миокарда. *Гены и клетки*. 2018;13(3):82–8]. DOI: 10.23868/201811038
36. Kindrick JD, Mole DR. Hypoxic Regulation of Gene Transcription and Chromatin: Cause and Effect. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(21):8320. DOI: 10.3390/ijms21218320
37. Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular Imaging of Hypoxia. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(Suppl 2):129S-148S. DOI: 10.2967/jnumed.107.045914
38. Nordmark M, Lancaster J, Aquino-Parsons C, Chou S-C, Ladekarl M, Havsteen H et al. Measurements of hypoxia using pimonidazole and polarographic oxygen-sensitive electrodes in human cervix carcinomas. *Radiotherapy and Oncology*. 2003;67(1):35–44. DOI: 10.1016/S0167-8140(03)00010-0
39. Sanada F, Kim J, Czarna A, Chan NY-K, Signore S, Ogóreck B et al. c-Kit-Positive Cardiac Stem Cells Nested in Hypoxic Niches Are Activated by Stem Cell Factor Reversing the Aging Myopathy. *Circulation Research*. 2014;114(1):41–55. DOI: 10.1161/CIRCRESA-NA.114.302500
40. Romano N, Ceci M. The face of epicardial and endocardial derived cells in zebrafish. *Experimental Cell Research*. 2018;369(1):166–75. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.05.022
41. Dergilev K.V., Rubina K.A., Parfenova E.V. Resident cardiac stem cells. *Kardiologija*. 2011;51(4):84–92. [Russian: Дергилев К.В., Рубина К.А., Парфенова Е.В. Резидентные стволовые клетки сердца. *Кардиология*. 2011;51(4):84–92. PMID: 21623726]
42. Iancu CB, Iancu D, Rențea I, Hostiuc S, Dermengiu D, Rusu MC. Molecular signatures of cardiac stem cells. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2015;56(4):1255–62. PMID: 26743269
43. Scalise M, Marino F, Cianflone E, Mancuso T, Marotta P, Aquila I et al. Heterogeneity of Adult Cardiac Stem Cells. P. 141-178. DOI: 10.1007/978-3-030-24108-7_8. In: *Stem Cells Heterogeneity in Different Organs*. [ISBN: 978-3-030-24107-0, 978-3-030-24108-7. Series Title: *Advances in Experimental Medicine and Biology*]. Birbrair A, editor - Cham: Springer International Publishing;2019.
44. Samal R, Sappa PK, Gesell Salazar M, Wenzel K, Reinke Y, Völker U et al. Global secretome analysis of resident cardiac progenitor cells from wild-type and transgenic heart failure mice: Why ambience matters. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(7):10111–22. DOI: 10.1002/jcp.27677
45. Balakrishnan S, Hartman CW, Grinnan GL, Bartel AG, Crisler C, Brickman RD. Pericardial fluid gas analysis in hemorrhagic pericardial tamponade. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1979;27(1):55–8. DOI: 10.1016/s0003-4975(10)62971-2
46. de Laforcade AM, Freeman LM, Rozanski EA, Rush JE. Biochemical analysis of pericardial fluid and whole blood in dogs with pericardial effusion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2005;19(6):833–6. PMID: 16355677
47. Li T, Mao C, Wang X, Shi Y, Tao Y. Epigenetic crosstalk between hypoxia and tumor driven by HIF regulation. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2020;39(1):224. DOI: 10.1186/s13046-020-01733-5
48. Higgins DF, Kimura K, Iwano M, Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle*. 2008;7(9):1128–32. DOI: 10.4161/cc.7.9.5804
49. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Traktuev D.O., Gorelova A.V., Zubko A.V. et al. Intramyocardial Injection of Plasmid Encoding Platelet Growth Factor Increases Epicardial-Mediated Post Infarction Myocardial Vascularization (Experimental Study). *General Reanimatology*. 2020;16(6):54–64. [Russian: Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Трактюев Д.О., Горелова А.В., Зубко А.В. и др. Интрамиокардиальное введение плазмиды, кодирующей фактор роста тромбоцитов, способствует увеличению эпикардопосредованной васкуляризации постинфарктного сердца (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2020;16(6):54–64]. DOI: 10.15360/1813-9779-2020-6-54-64
50. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cuñado M, Zhao M, Maruyama S et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature*. 2015;525(7570):479–85. DOI: 10.1038/nature15372
51. Widera C, Horn-Wichmann R, Kempf T, Bethmann K, Fiedler B, Sharma S et al. Circulating Concentrations of Follistatin-Like 1 in Healthy Individuals and Patients with Acute Coronary Syndrome as Assessed by an Immunoluminometric Sandwich Assay. *Clinical Chemistry*. 2009;55(10):1794–800. DOI: 10.1373/clinchem.2009.129411