

## Интрамиокардиальное введение плазмиды, кодирующей фактор роста тромбоцитов, способствует увеличению эпикардопосредованной васкуляризации постинфарктного сердца (экспериментальное исследование)

К. В. Дергилев<sup>1</sup>, З. И. Цоколаева<sup>1,2</sup>, И. Б. Белоглазова<sup>1</sup>, Д. О. Трактует<sup>2,3</sup>,  
А. В. Горелова<sup>3,4</sup>, А. В. Зубко<sup>5</sup>, Б. Н. Кульбицкий<sup>6</sup>, Е. В. Парфенова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной кардиологии  
Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России,  
Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

<sup>2</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКИЦ РР,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>3</sup> Центр регенеративной медицины, Медицинское отделение, Медицинский колледж, Университет Флориды,  
США, Флорида 32610, Гейнсвилл, M421, 1600 SW Арчер рд.

<sup>4</sup> Университет Манчестера, Факультет Биологии, Медицины и Здоровья,  
Великобритания, Манчестер, Оксфорд-Роуд, M13 9PL

<sup>5</sup> Национальный медицинский научно-исследовательский центр  
сердечно-сосудистой хирургии им. Бакулева Минздрава России,  
Россия, 121552, г. Москва, Рублевское шоссе, д. 135

<sup>6</sup> Госпиталь для ветеранов войн № 3, Департамент здравоохранения г. Москвы,  
Россия, 129336, г. Москва, ул. Стартовая, д. 4

## Intramyocardial Injection of Plasmid Encoding Platelet Growth Factor Increases Epicardial-Mediated Post Infarction Myocardial Vascularization (Experimental Study)

Konstantin V. Dergilev<sup>1</sup>, Zoya I. Tsokolaeva<sup>1,2</sup>, Irina B. Beloglazova<sup>1</sup>, Dmitry O. Traktuev<sup>2,3</sup>,  
Alina V. Gorelova<sup>3,4</sup>, Alexander V. Zubko<sup>5</sup>, Boris N. Kulbitsky<sup>6</sup>, Elena V. Parfenova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Experimental Cardiology, National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia,  
15a 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya Str., 121552 Moscow, Russia

<sup>2</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology,  
25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Center for Regenerative Medicine, Department of Medicine, College of Medicine, University of Florida,  
1600 SW Archer Rd, M421 Gainesville, FL 32610 USA

<sup>4</sup> Manchester University, Faculty of Biology, Medicine and Health,  
M13 9PL Oxford Road, Manchester, Great Britain

<sup>5</sup> Center for Cardiovascular Surgery, Ministry of Health of Russia  
135 Rublevskoe highway, 121552 Moscow, Russia

<sup>6</sup> No. 3 Hospital for War Veterans, Moscow Department of Health,  
4 Startovaya Str., 129336 Moscow, Russia

**Для цитирования:** К. В. Дергилев, З. И. Цоколаева, И. Б. Белоглазова, Д. О. Трактует, А. В. Горелова, А. В. Зубко, Б. Н. Кульбицкий, Е. В. Парфенова. Интрамиокардиальное введение плазмиды, кодирующей фактор роста тромбоцитов, способствует увеличению эпикардопосредованной васкуляризации постинфарктного сердца (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2020; 16 (6): 54–64. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-6-54-64>. [На русск. и англ.]

**For citation:** Konstantin V. Dergilev, Zoya I. Tsokolaeva, Irina B. Beloglazova, Dmitry O. Traktuev, Alina V. Gorelova, Alexander V. Zubko, Boris N. Kulbitsky, Elena V. Parfenova. Intramyocardial Injection of Plasmid Encoding Platelet Growth Factor Increases Epicardial-Mediated Post Infarction Myocardial Vascularization (Experimental Study). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology*. 2020; 16 (6): ??–??. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-6-54-64>. [In Russ. and Engl.]

### Резюме

Прогрессирующие темпы распространения заболеваний ишемической природы и ограниченность средств для лечения стимулирует рост интереса к изучению механизмов васкуляризации и поиску новых подходов, направленных на ее стимуляцию. Одним из таких подходов является генная терапия, направленная на активацию эпикарда, что обеспечивает образование васкулогенных клеток-предшественниц и секреторную поддержку «сборки» сосудов *de novo*.

**Цель** — изучить возможность активации клеток эпикарда и постинфарктной васкуляризации сердца путем введения генетической конструкции, кодирующей PDGFBB.

**Материал и методы.** В работе использована модель экспериментального инфаркта миокарда у крысы с последующим интрамиокардиальным введением физиологического раствора, контрольной плазмиды и плазмиды, кодирующей PDGFBB. Исследование влияния PDGF на активность клеток эпикарда выполнено на модели *ex vivo*, а также клеточной культуре мезотелия *in vitro*.

#### Адрес для корреспонденции:

Константин Владимирович Дергилев  
E-mail: doctorkote@gmail.com  
Зоя Ивановна Цоколаева  
E-mail: tsokolaevazoya@mail.ru

#### Correspondence to:

Konstantin V. Dergilev  
E-mail: doctorkote@gmail.com  
Zoya I. Tsokolaeva  
E-mail: tsokolaevazoya@mail.ru

**Результаты.** Постинфарктное введение плазмиды, кодирующей PDGFBB, способствует увеличению плотности сосудистой сети в периинфарктной области, а также миграции перicyтов в зону повреждения. PDGFBB способствует активации пула клеток эпикарда, повышению экспрессии в них маркеров гладкомышечных клеток (показано на модели *ex vivo*) и появлению признаков активации эпителиально-мезенхимального перехода (*in vitro*).

**Заключение.** Внутримиекардиальное введение генетической конструкции, кодирующей PDGF, после экспериментального инфаркта стимулировало васкуляризацию периинфарктной зоны, что могло быть отчасти обусловлено активацией эпикардиального пула клеток.

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда; клетки эпикарда; фактор роста тромбоцитов; васкуляризация; репарация сердца

**Благодарность.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-015-00438 и гранта РНФ 17-15-01368 (модель активации эпикарда *ex vivo*).

## Summary

Increasing incidence of ischemic diseases and limited resources for their treatment stimulate increased interest in studying the mechanisms of vascularization and finding new approaches for its promotion. One of these approaches is gene therapy aimed at activating the epicardium to produce the vascular precursor cells and microenvironment for the «assembly» of de novo vessels.

**The aim** is to investigate the possibility of activating epicardial cells and post infarction cardiac vascularization by injecting a genetic construct encoding PDGFBB.

**Material and methods.** A model of experimental myocardial infarction in a rat with subsequent intramyocardial injection of normal saline solution, control plasmid and plasmid encoding PDGFBB was used. The study of PDGFBB effect on epicardial cell activity was performed on the *ex vivo* model, as well as *in vitro* mesothelial cell culture.

**Results.** Post infarction injection of plasmid encoding PDGFBB increases the density of the vascular network in the peri-infarct area as well as migration of pericytes to the injured zone. PDGFBB promotes activation of epicardial cell pool and expression of smooth muscle cell markers in them (shown on the *ex vivo* model), as well as stimulates activation of epithelial-mesenchymal transition (*in vitro*).

**Conclusion.** Intramyocardial injection of a genetic construct encoding PDGFBB after an experimental myocardial infarction stimulated vascularization of the peri-infarction zone, which may have been partially due to the activation of the epicardial cell pool.

**Keywords:** myocardial infarction; epicardial cells; platelet growth factor; vascularization; heart repair

**Acknowledgments.** The study was supported financially by Russian Foundation for Basic Research grant No.18-015-00438 and Russian Science Foundation grant No.17-15-01368 (epicardial activation model *ex vivo*).

<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2020-6-54-64>

## Введение

Ишемическая болезнь сердца и острый инфаркт миокарда по-прежнему являются ведущими причинами инвалидизации и летальности населения во всем мире. Результаты эпидемиологических исследований показывают, что острый инфаркт миокарда является причиной более половины случаев развития сердечной недостаточности как со сниженной, так и с сохранной фракцией выброса. Несмотря на значительный прогресс в лечении больных инфарктом миокарда, связанный со своевременным проведением тромболитической терапии и чрескожных коронарных вмешательств, своевременное восстановление коронарной перфузии, хотя и способно ограничить зону некроза и уменьшить госпитальную летальность, не является инструментом для полного восстановления поврежденного миокарда. Постинфарктное ремоделирование левого желудочка

## Introduction

Coronary heart disease and acute myocardial infarction are still the leading causes of morbidity and mortality around the world. The results of epidemiological studies show that acute myocardial infarction causes more than half of the cases of heart failure with both reduced and preserved ejection fraction. Despite significant progress in the treatment of patients with myocardial infarction associated with timely thrombolysis and percutaneous coronary interventions, a prompt restoration of coronary perfusion, although capable of limiting zone of necrosis and reducing hospital mortality, is not the way to fully restore the damaged myocardium. Post infarction remodeling of the left ventricle (LV), which simultaneously affects intact and damaged areas of the myocardium, leads to a significantly disturbed geometry and marked dilatation of the myocardium underlying development of chronic heart failure. According to the lat-

(ЛЖ), одновременно затрагивающее интактные и поврежденные области миокарда, приводит к существенному нарушению его геометрии и выраженной дилатации сердца, что становится морфологической основой для развития хронической сердечной недостаточности. Согласно последним представлениям [1], стимуляция эндогенных механизмов васкуляризации является перспективной стратегией лечения таких пациентов. В связи с этим, разработка новых подходов воздействия на ангио-/васкулогенез и изучение механизмов формирования новых кардиомиоцитов остается перспективной задачей современной кардиологии.

В основе постинфарктной васкуляризации лежит образование сосудистых структур, покрытых эндотелиальными клетками, в патологически измененном микроокружении зоны повреждения [2]. Эти структуры возникают как в результате васкулогенеза, когда *de novo* формируются кровеносные сосуды из отдельных клеток-предшественников, так и ангиогенеза, когда прорастание новых сосудов происходит из уже существующих сосудов. Первично сформированные эндотелиальные трубки нуждаются в своевременной стабилизации за счет привлечения и распределения по их поверхности перicytes и гладкомышечных клеток [3]. Этот этап представляет собой критическое событие, контролирующее дальнейшее ремоделирование, созревание и стабилизацию будущих полноценных сосудов. Он контролируется различными сигнальными механизмами, запускаемыми гипоксией, а также — действием различных факторов роста и цитокинов, которые регулируют клеточный метаболизм, миграцию клеток-предшественниц и поэтапное построение новых сосудов.

Одним из таких регуляторов является фактор роста тромбоцитов BB (platelet-derived growth factor BB, PDGFBB), представляющий собой белок с молекулярной массой 30 кДа, который впервые был выделен из тромбоцитов человека [4]. Посредством взаимодействия с тирозинкиназными рецепторами PDGFR- $\alpha$  и PDGFR- $\beta$  этот фактор регулирует проангиогенные функции клеток за счет VEGF-зависимых и независимых механизмов [5–7]. Многочисленные исследования указывают на эффективность его использования для стимуляции роста сосудов и регуляции репаративных процессов [8, 9]. При этом механизмы данного процесса остаются предметом изучения.

В рамках данной работы мы впервые предположили, что одной из возможных точек приложения его действия могут быть клетки эпикарда [10]. В период эмбриогенеза PDGFBB оказывает активирующее действие на эпикардальный пул клеток и запускает многоступенча-

est concepts [1], stimulation of endogenous vascularization mechanisms is a promising strategy to treat such patients. In this regard, the development of new approaches to angiogenesis and the study of mechanisms of new cardiomyocyte formation remains a perspective challenge of modern cardiology.

The basis of post infarction vascularization is the formation of vascular structures covered with endothelial cells in an altered microenvironment of the injured zone [2]. These structures emerge both as a result of vasculogenesis, when the new vessels form *de novo* from individual precursor cells, and angiogenesis, when new vessels sprout from existing ones. Primarily developed endothelial tubes need timely stabilization by attracting the pericytes and smooth muscle cells and positioning them on the surface [3]. This stage is a critical event controlling further remodeling, maturation and stabilization of future fully functional vessels. It is controlled by various signaling mechanisms triggered by hypoxia, as well as by various growth factors and cytokines regulating cell metabolism, migration of precursor cells, and gradual development of new vessels.

One such regulator is the platelet-derived growth factor BB (PDGFBB), which is a protein with a molecular weight of 30 kDa that was first isolated from human platelets [4]. By interaction with tyrosine kinase receptors PDGFR- $\alpha$  and PDGFR- $\beta$  this factor regulates proangiogenic cell functions through VEGF-dependent and independent mechanisms [5–7]. Numerous studies indicate its effectiveness in stimulating vascular growth and regulating repair processes [8, 9]. At the same time, the mechanisms of this process remain to be explored.

In this work, we first suggest that one of the possible application points for its action could be epicardial cells [10]. During embryogenesis, PDGFBB has an activating effect on the epicardial cell pool and triggers a multistage process of transformation, entry into epithelial-mesenchymal transition associated with enhanced proliferative, migratory, secretory activity and specification/differentiation into endothelial, smooth muscle cells and pericytes [11]. Despite the important role of PDGFBB in coronary histogenesis [12], its importance in the postnatal heart, reparative vascularization and regulation of epicardial cell functions remains poorly studied. In our study we suggested that intramyocardial introduction of PDGFBB-coding genetic construct after myocardial infarction may facilitate epicardial cells activation and vascular network restoration.

## Materials and Methods

Experiments on modeling myocardial infarction were carried out on Wistar line male rats kept in the nursery of laboratory animals of the Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Cardiol-



тый процесс трансформации, вступления в эпителиально-мезенхимальный переход, связанный с усилением пролиферативной, миграционной, секреторной активности и спецификацией/дифференцировкой в направлении эндотелиальных, гладкомышечных клеток и перицитов [11]. Несмотря на важную роль PDGFBB в гистогенезе коронарных сосудов [12], его значение в постнатальном сердце, репаративной васкуляризации и регуляции функций клеток эпикарда остается недостаточно изученным. В рамках данной работы мы предположили, что внутримиекардиальное введение генетической конструкции, кодирующей PDGFBB, после инфаркта миокарда может способствовать активации эпикардиальных клеток и восстановлению сосудистой сети.

## Материал и методы

Эксперименты по моделированию инфаркта миокарда проводили на крысах-самцах линии Wistar, содержащихся в питомнике лабораторных животных ФГБУ Научный медицинский исследовательский центр кардиологии (НМИЦ) Минздрава России. Для создания модели активации эпикарда *ex vivo* и выделения клеток использованы мыши линии C57Bl/6. Все необходимые манипуляции выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС по экспериментам на животных; они были одобрены этическим комитетом ФГБУ НМИЦ кардиологии (разрешение № 385 от 06. 2009).

**Клонирование вектора pVAX1-PDGF-Bopt.** Нуклеотидная последовательность гена PDGF-B человека была оптимизирована с сохранением нативной аминокислотной последовательности белка. Оптимизация проводилась по алгоритму компании Genescript. Оптимизированный PDGF-B был синтезирован с добавлением модифицированной последовательности Козак (GGCATTCGCTACTGTTGGTAAAGCCACC) непосредственно перед стартовым ATG кодоном и фланкирован последовательностями сайтов узнавания рестриктаз EcoR1 (5'-конец) и EcoRV (3'-конец). Далее оптимизированный ген был клонирован в вектор pUC57 (Genescript) по сайтам узнавания рестриктаз EcoR1 и EcoRV. Из полученной плазмиды pUC57-PDGF-Bopt ген PDGF-B (767 п.о.) был вырезан рестриктазами EcoR1 и EcoRV и клонирован в вектор pVAX1 (3000 п.о.) по сайтам узнавания этих же рестриктаз. Встраивание последовательности оптимизированного PDGF-B и ее идентичность подтверждали анализом рестрикции и секвенированием. Подробное описание плазмидного вектора и данные по оценке его эффективности опубликованы ранее [13].

**Моделирование инфаркта миокарда и введение генетических конструкций в миокард.** Экспериментальный инфаркт миокарда воспроизводили по описанной ранее методике [14]. Животных разделили на 3 группы: 1-я контрольная группа, в которой крысам интрамиокардиально вводили физиологический раствор хлорида натрия; 2-я контрольная группа, в которой животным интрамиокардиально вводили «пустую» плазмиду pVAX1 («Addgene», США) (без гена фактора роста в дозе 200 мкг); 3-я опытная группа, в которой животным вводили генный пре-

ог (NMRCC) of the Russian Ministry of Health. Mice of line C57Bl/6 were used to create an epicardial activation model *ex vivo* and perform cell isolation. All the necessary manipulations were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EC on animal experimentation; they were approved by the Ethics Committee of the NMRCC (Resolution No. 385 of 06. 2009).

**Cloning of the vector pVAX1-PDGF-Bopt.** The nucleotide sequence of the human PDGF-B gene was optimized while maintaining the native amino acid sequence of the protein. Optimization was carried out according to the algorithm of the Genescript company. Optimized PDGF-B gene was synthesized with the addition of a modified Kozak sequence (GGCATTCGCTACTGTTGGTAAAGCCACC) just before the ATG start codon and flanked by the sequences of EcoR1 (5'end) and EcoRV (3'end) restriction enzyme recognition sites. Next, the optimized gene was cloned into the pUC57 vector (Genescript) using the EcoR1 and EcoRV restriction enzyme recognition sites. From the resulting plasmid pUC57-PDGF-Bopt, Then, the PDGF-B gene (767 bp) was excised from the resulting plasmid pUC57-PDGF-Bopt at the EcoR1 and EcoRV sites and re-cloned into the pVAX1 vector (3000 bp) at the recognition sites of the same restriction enzymes. Sequence insertion of the optimized PDGF-B and its identity was confirmed by restriction analysis and sequencing. A detailed description of the plasmid vector and data on the assessment of its effectiveness have been published earlier [13].

**Modeling of myocardial infarction and introduction of genetic constructs into myocardium.** The experimental myocardial infarction was reproduced using the predefined technique [14]. Animals were divided into 3 groups: 1st control group, in which rats were injected intramyocardially with saline; 2nd control group, in which animals were injected with an «empty» plasmid pVAX1 («Addgene», USA (without growth factor gene), 200 µg; 3rd study group, where animals were administered with a gene preparation pVAX1-PDGF-Bopt based on a plasmid carrying PDGF-BB gene, at a similar dose of 200 µg.

**Evaluation of cardiac vascularization after a myocardial infarction.** Frozen myocardial cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (20 minutes at 37°C) and washed with a phosphate-buffered solution (PBS). Myocardial cryosections were blocked with a solution containing 1% BSA (bovine serum albumin), 10% serum of donor second antibodies in PBS (30 min). The cryosections were then stained with antibodies to Pecam endothelial cell marker (CD31, «Becton Dickinson», USA) and pericytes/smooth muscle cells NG2 («Becton Dickinson», USA) for 1 hour, then washed and stained with antibodies conjugated with Alexa Fluor™ 488 and Alexa Fluor™ 594 («Invitrogen», USA, 1:800, 1 h at 37°C). Quantitative analysis of vascular structures and pericytes was performed using the Image J software («NIH», USA).

**Creation of an epicardium activation model *ex vivo*.** The *ex vivo* model was used to confirm the possibility of PDGFBB-mediated activation of the epicardial cell pool. The mice were anesthetized with avertin solution, intubated and put on mechanical lung ventilation (Harvard Apparatus, UK). The mice were fixed in the supine position and their chest tissues were separated layer by layer to provide access to the heart at the 5<sup>th</sup>–6<sup>th</sup> intercostal space. A 10 µl PKH26 fluorescent membrane dye («Sigma Aldrich», USA) was injected into the pericardial

парат pVAX1-PDGF-Vopt на основе плазмиды, несущей ген PDGF-BB (в дозе 200 мкг).

**Оценка васкуляризации сердца после инфаркта.** Замороженные криосрезы миокарда фиксировали 3,7% параформальдегидом (20 минут при 37° C) и промывали фосфатно-солевым буфером. Срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% раствор альбумина быка, 10% сыворотки донора вторых антител в фосфатно-солевом буфере (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркеру клеток эндотелия Ресам (CD31, «Becton Dickinson», США) и перидитов/гладкомышечных клеток NG2 («Becton Dickinson», США) в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor™ 488 и Alexa Fluor™ 594 («Invitrogen», США, 1: 800, 1 ч при 37° C). Количественный анализ сосудистых структур и перидитов проводили с помощью программы Image J («NIH», США).

#### Создание модели активации эпикарда *ex vivo*.

Для подтверждения возможности PDGF-опосредованной активации эпикардального пула клеток была использована модель *ex vivo*. Мышей наркотизировали раствором авертина, интубировали трахею и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких («Harvard Apparatus», Великобритания). Мышь фиксировали на спине, делали послойное разделение тканей грудной клетки для обеспечения доступа к сердцу в 5–6-ом межреберье. В полость перикарда вводили 10 мкл флуоресцентного мембранного красителя PKH26 («Sigma Aldrich», США), выдерживали 5 минут, после чего перикард вскрывали и удаляли введенную жидкость. Сердце промывали в растворе Кребса-Хенселейта («Sigma», США) и помещали в культуральную чашку, содержащую базовую среду (IMDM; «Gibco», США) или базовую среду с добавлением PDGFBB («R&D», США; 50 нг/мл). Через трое суток сердца извлекали, замораживали и готовили криосрезы для последующего гистологического тестирования. Для подтверждения специфического введения метки PKH26 в клетки эпикарда использовали окрашивание криосрезом первичными антителами к маркеру Wt1 («Abcam», США) и вторичными антителами, конъюгированными с AlexaFluor488 («Invitrogen», США). Для детекции гладкомышечного альфа-актина в PKH26-позитивных клетках проводили окрашивание антителами, конъюгированным с красителем FITC («Sigma», США). Визуализацию PKH26-позитивных клеток эпикарда, оценку их миграции и морфометрию проводили с помощью программы Image J («NIH», США).

**Выделение и культивирование клеток эпикарда мыши для исследования эффектов PDGFBB.** Для получения постнатальных клеток эпикарда сердца новорожденных мышат извлекали из грудной полости, промывали в растворе Кребса-Рингера с гепарином, переносили в 5 мл раствора трипсина (в расчете на 6 сердец) и инкубировали 3 раза по 5 минут при 37° C в термошейкере Hybaid («Thermo Scientific», США). После этого извлекали сердца, к полученной суспензии клеток добавляли 5 мл среды для инактивации фермента и центрифугировали при 300 g в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали в среде для клеток эпикарда (IMDM («Thermo Fisher», США) с добавлением 1% сыворотки плода коровы и ингибитора SB431542 10 мкМ («TRC», США)

cavity and left there for 5 minutes, after which the pericardium was opened and the injected fluid was removed. The heart was washed in Krebs-Henseleit solution («Sigma», USA) and placed in a culture dish containing basal medium (IMDM; «Gibco», USA) or basal medium with addition of PDGFbb («R&D», USA; 50 ng/ml). After three days, the heart was removed, frozen and prepared for histological testing. To confirm the specific introduction of PKH26 label into epicardial cells, the cryosections were stained with primary antibodies to Wt1 marker («Abcam», USA) and secondary antibodies conjugated with AlexaFluor488 («Invitrogen», USA). For the detection of smooth-muscular alpha-actin, the PKH26-positive cells were stained with antibodies conjugated with FITC dye («Sigma», USA). Visualization of PKH26-positive epicardial cells, evaluation of their migration and morphometry were performed using the Image J software («NIH», USA).

#### Isolation and culturing of murine epicardial cells for studying the effects of PDGFBB.

To obtain postnatal epicardial cells, the hearts of newborn mice were extracted from the thoracic cavity, washed in Krebs-Ringer solution with heparin, transferred in 5 ml of trypsin solution (for 6 hearts) and incubated 3 times for 5 minutes at 37°C in Hybaid thermoshaker («Thermo Scientific», USA). After that, the hearts were extracted, 5 ml of enzyme inactivation medium was added to the obtained cell suspension which was centrifuged at 300 g for 10 minutes. The sediment was resuspended in an epicardial cell environment (IMDM («Thermo Fisher», USA) + 1% fetal calf serum («ATCC», USA) + SB431542 inhibitor 10 мкМ («TRC», USA) and transferred to gelatin-coated dishes. The medium was replaced every 2 days. Epicardial cell clones obtained with cloning cylinders («Sigma», USA) with confirmed immunophenotype and morphology were used for the experiments. Recombinant PDGFBB («R&D», USA; 50 ng/ml, incubation for 5 days with daily medium replacement) was used to stimulate epicardial cells.

**Characterization of epicardial cell immunophenotype *in vivo*.** The immunophenotype of explant culture cells was analyzed using immunocytochemistry. The cells were stained with antibodies to markers Wt1 («Abcam», USA), Kalponin («Abcam», USA) for 1 hour, then washed and stained with antibodies conjugated with AlexaFluor488 («Invitrogen», USA). For the detection of smooth-muscular alpha-actin, additional staining with antibodies conjugated with FITC dye («Sigma», USA) was performed. For the imaging of actin cytoskeleton, the staining with falloidin conjugated with the Alexa Fluor™ 594 dye («Thermo Fisher Scientific Inc», USA) was performed. Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride) (Sigma, USA).

**Microscopy and image analysis.** Cell and myocardial cryosections were analyzed using a Zeiss Axiovert 200M fluorescent microscope (Carl Zeiss, Germany) and Axiovision 3.1 software (Carl Zeiss, Germany).

## Results and Discussion

Examination of rat myocardial samples on the 14<sup>th</sup> day after modeling the coronary occlusion showed that in the area adjacent to that of necrosis, a significant number of newly generated capillaries with random location were visualized. Morphome-

и переносили в чашки, покрытые желатином. Замену среды проводили через каждые 2 дня. Для проведения экспериментов использовали клоны клеток эпикарда, полученные с помощью цилиндров для клонирования («Sigma», США), имевшие подтвержденный иммунофенотип и морфологию. Для стимуляции клеток эпикарда использовали рекомбинантный PDGFBB («R&D», США; 50 нг/мл, инкубация 5 суток с ежедневной заменой среды).

**Характеристика иммунофенотипа эпикардальных клеток *in vivo*.** Анализ иммунофенотипа клеток эксплантной культуры проводили с помощью иммуноцитохимии. Клетки окрашивали антителами к маркерам Wt1 («Abcam», США), калпонин («Abcam», США), в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с AlexaFluor488 («Invitrogen», США). Для детекции гладкомышечного альфа-актина проводили дополнительное окрашивание антителами, конъюгированным с красителем FITC («Sigma», США). Для визуализации актинового цитоскелета проводили окрашивание фаллоидином, конъюгированным с красителем Alexa Fluor™ 594 («Thermo Fisher Scientific Inc», США). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) («Sigma», США).

**Микроскопия и анализ изображений.** Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 («Carl Zeiss», Германия).

## Результаты и обсуждение

Исследование образцов миокарда крысы на 14-й день после моделирования коронарной окклюзии показало, что в зоне, пограничной с областью некроза, визуализировалось значительное количество сформированных капилляров, имевших хаотичное расположение. Проведенные морфометрические подсчеты не выявили достоверных различий в числе капилляров (структур без просвета, окрашивавшихся на CD31) в контрольных группах и в группе с введением генного препарата (рис. 1). При этом количество сосудов с видимым просветом, имевших слой NG2-позитивных клеток, было в 2,7 и 1,9 раз больше после генной терапии, чем в контрольных группах (введение физиологического раствора и «пустого» вектора, соответственно), что свидетельствовало о стимуляции ангиогенеза, но не ангиогенеза при экспрессии PDGFBB.

Согласно данным литературы, PDGFBB может регулировать миграцию гладкомышечных клеток/перицитов и их участие в стабилизации новообразованных сосудов [15]. Анализ количества NG2-позитивных клеток (перицитов) в миокарде, не входивших в состав сосудов (рис. 1), показал, что в 1-й контрольной группе (физиологический раствор) среднее число NG2-позитивных клеток составило  $11,2 \pm 3,5$  клеток в поле зрения, во 2-й контрольной группе (пустой вектор) —  $9,7 \pm 2,0$ , а в группе с введением плазмидного препарата —  $19,5 \pm 6,3$  клеток, что было

atric calculations did not reveal any significant differences in the number of capillaries (structures without lumen stained on CD31) in control groups and in the study group who had gene injection (fig. 1). At the same time, the number of vessels with visible lumen, which had a layer of NG2-positive cells, was 2.7 and 1.9 times greater after the gene therapy than in the control groups (injection of normal saline solution and «empty» vector, respectively), which indicated the stimulation of arteriogenesis but not angiogenesis in PDGFBB expression.

According to the literature, PDGFBB can regulate the migration of smooth muscle cells/pericytes and their participation in the stabilization of new blood vessels [15]. Analysis of the number of extravascular NG2-positive cells (pericytes) in myocardium (fig. 2). 1), showed that in the 1st control group (normal saline) the average number of NG2-positive cells was  $11.2 \pm 3.5$  per vision field, in the 2<sup>nd</sup> control group («empty» vector) it was  $9.7 \pm 2.0$ , while in the study group with plasmid injection it reached  $19.5 \pm 6.3$  cells, which was significantly greater than in the comparison groups. About one third of all NG2-positive cells (in all groups) were localized in the epicardium/subepicardium region, which suggested their possible formation by epithelial-mesenchymal transformation of epicardial mesothelial cells. During embryogenesis and after acute ischemic injury, the entry of proepicardial/subepicardial cells into epithelial-mesenchymal transition is the key mechanism of mesenchymal cell generation for coronary vessels and myocardial connective tissue framework formation [15].

To confirm the potential of PDGFBB to mediate the activation of an epicardial cell pool causing the formation of smooth muscle cells/pericytes, experiments were carried out using the heart model *ex vivo*. Hearts of mice with a fluorescently labeled epicardium were cultured *in vitro* in a medium with or without PDGFBB and cryosections were prepared after three days for histological studies. After the injection of fluorescent dye, we confirmed that the label (PKH26) specifically stains the surface layer of the cells of the left ventricular wall and colocalizes with the marker Wt1, which indicates its specific inclusion in the mesothelial cells and the possibility of using the model to trace the fate of epicardial cells.

Culturing *ex vivo* hearts in an environment with added PDGFBB has been found to cause directed migration of PKH26-positive epicardial cells into the underlying layers of the cardiac wall in comparison with samples of control hearts. The migration of PKH26-positive cells was practically not observed in the control group. Immunofluorescent staining of myocardial sections showed that part of PKH26-positive epicardial cells was positively stained with antibodies to smooth-muscular alpha-actin (SMA), which indicates differentiation into



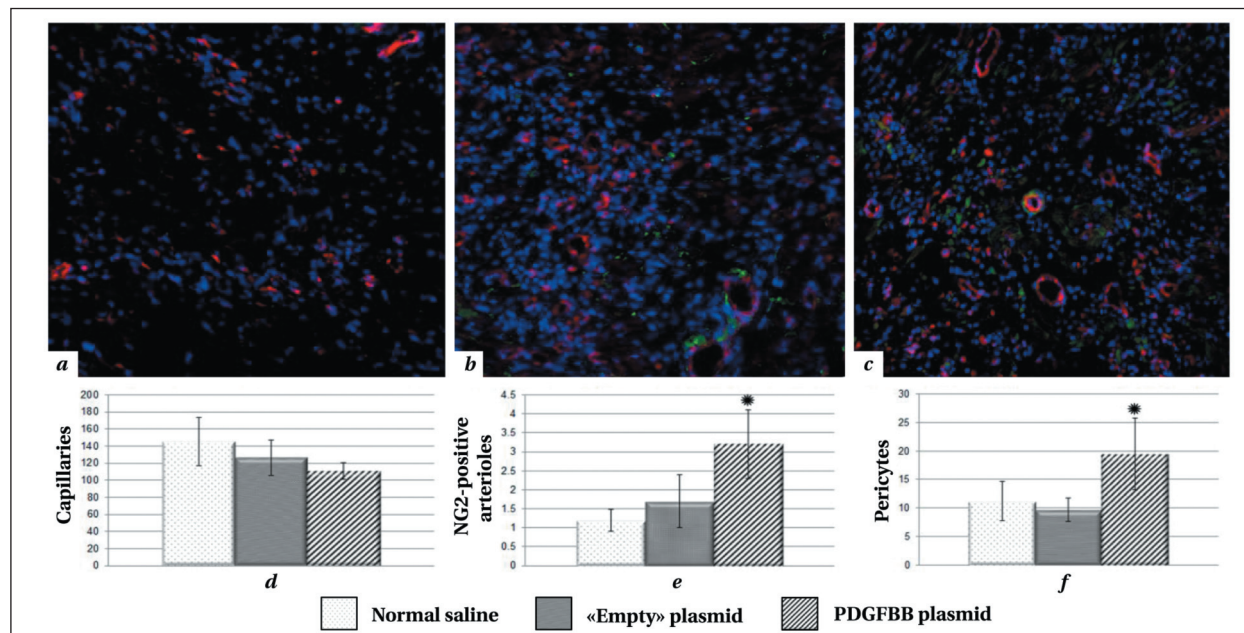


Рис. 1. Оценка васкуляризации перинфарктной области сердца через 14 суток после инфаркта миокарда.

Fig. 1. Assessment of the periinfarction area: vascularisation in 14 days after myocardial infarction.

**Note.** *a-c* — representative images of myocardial sections that following administration of normal saline (*a*), «empty» plasmid (*b*) or PDGFBB plasmid (*c*) were stained with antibodies to endothelial marker CD31 (red) and smooth muscular cells NG2 (green). Cell nuclei are counterstained with DAPI. *d-f* — diagrams of quantitative evaluation of the number of capillaries (*d*), NG2-positive arterioles (*e*) and individual pericytes (*f*) in control groups and after administration of PDGFBB plasmid. \* —  $P < 0.05$ .

**Примечание.** Normal saline — физ. раствор; «empty» plasmid — «пустая» плазмиды. *a-c* — репрезентативные изображения окрашивания срезов миокарда (введение физиологического раствора — *a*), «пустой» плазмиды (*b*) и PDGFBB плазмиды (*c*) антителами к маркеру эндотелия CD31 (красный) и гладкомышечных клеток NG2 (зеленый). Ядра клеток докрасшены DAPI. *d-f* — графики количественной оценки числа капилляров (*d*), NG2-позитивных артериол (*e*) и отдельных перицитов (*f*) в контрольных группах и после введения PDGFBB плазмиды. \* —  $p < 0,05$ .

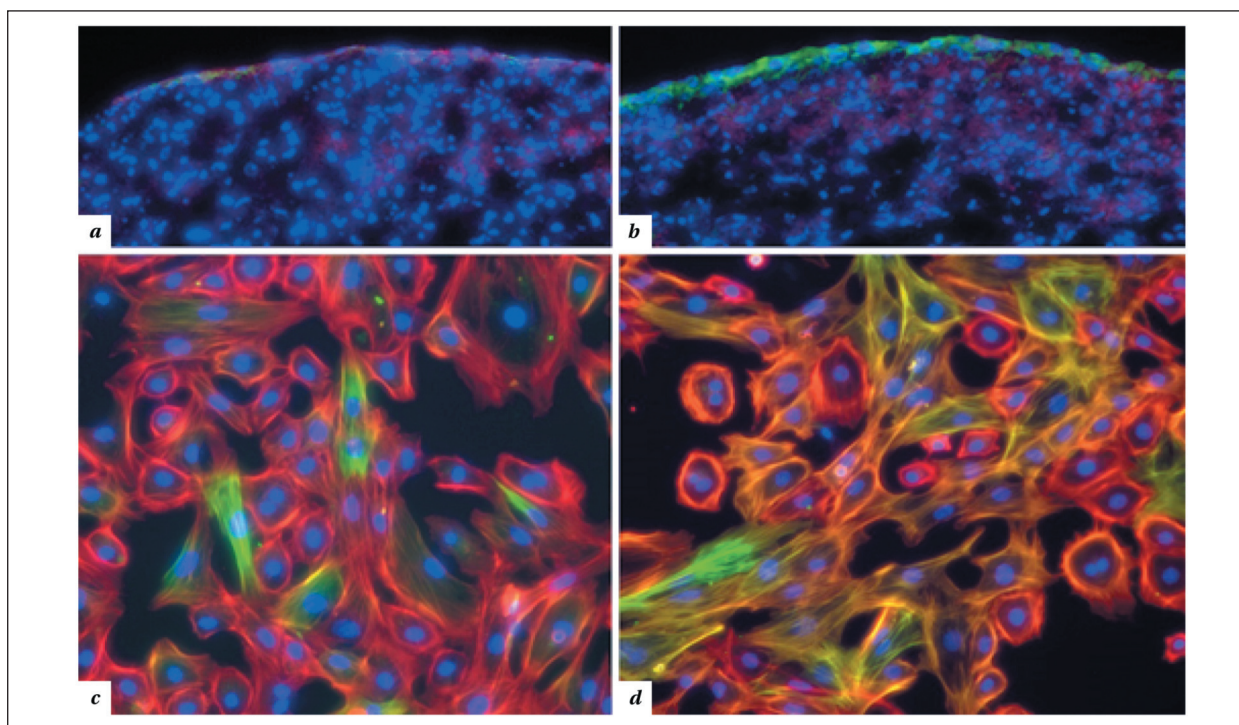
достоверно больше, чем в группах сравнения. Около трети всех NG2-позитивных клеток (во всех группах) локализовалось в области эпикарда/субэпикарда, что позволило предположить возможность их образования путем эпителиально-мезенхимальной трансформации клеток эпикардального мезотелия. В период эмбриогенеза и после острого ишемического повреждения вступление клеток проэпикарда/эпикарда в эпителиально-мезенхимальный переход является ключевым механизмом формирования мезенхимных клеток-предшественников для построения коронарных сосудов и соединительно-тканного каркаса сердца [15].

Для подтверждения возможности PDGFBB к опосредованной активации эпикардального пула клеток, вызывающей образование гладкомышечных клеток/перицитов, были проведены эксперименты с использованием модели сердца *ex vivo*. Сердца мышей с флуоресцентно меченным эпикардом культивировали *in vitro* в среде с добавлением PDGFBB или без него и через трое суток подготавливали криосрезы для гистологических исследований. После введения флуоресцентного красителя мы подтвердили, что метка (PKH26) специфично окрашивает поверхностный слой клеток стенки левого желудочка и колокализуется с марке-

smooth muscle cells. The total number of PKH+SMA-positive epicardial cells was 2.3 times greater after PDGFBB-stimulation than in control hearts, which may be suggestive of epicardial cell pool activation (fig. 2, *a, b*).

In order to study the possibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) stimulation in the epicardial cells under the action of PDGFBB, we conducted experiments *in vitro*. It was shown that when epicardial cells are cultured in a standard medium, they have «cobblestone» morphology, express Wt1 markers, demonstrate a low-organized cytoskeleton with a predominant distribution of actin filaments over the periphery of the cell. The addition of recombinant PDGFBB in the culture medium caused significant changes in cell culture (fig. 2, *c, d*). After PDGF stimulation, structured filaments of smooth-muscular alpha-actin and calponin were formed in epicardial cells, which were not visualized during culturing in a control medium. The obtained data suggest EMT activation producing pro-migratory phenotype and causing differentiation into pericytes/smooth muscle cells after PDGFBB stimulation.

The increasing incidence of ischemic diseases and limited availability of targeted treatments encourage growing interest in studying the mechanisms of vascularization and finding new ap-



**Рис. 2.** Оценка дифференцировочной способности клеток эпикарда в гладкомышечном направлении после стимуляции PDGFbb *in vitro* и *ex vivo*.

**Fig. 2.** Evaluation of epicardial cell ability of differentiation into smooth muscle after PDGFbb *in vitro* and *ex vivo* stimulation.

**Note.** *a, b* — representative images of myocardial sections staining with antibodies to smooth muscular alpha-actin (green) after culturing in control medium (*a*) and medium containing PDGFbb (epicardial activation model *ex vivo*, *b*). The epicardium is labeled with the fluorescent dye PKH26 (red). Cell nuclei are counterstained with DAPI. *c, d* — representative images of epicardial cell staining with antibodies to calponin (*c*, green) and smooth muscle alpha-actin (*d*, green) after culturing in the medium containing PDGFbb. Fibrillar actin is stained red. Cell nuclei are counterstained with DAPI.

**Примечание.** *a, b* — репрезентативные изображения окрашивания срезов сердца антителами к гладкомышечному альфа-актину (зеленый) после культивирования в контрольной среде (*a*) и среде, содержащей PDGFbb (модель активации эпикарда *ex vivo*, *b*). Эпикард помечен флуоресцентным красителем PKH26 (красный). Ядра клеток докрашены DAPI. *c, d* — репрезентативные изображения окрашивания клеток эпикарда антителами к калпонию (*c*, зеленый) и гладкомышечному альфа-актину (*d*, зеленый) после культивирования в среде, содержащей PDGFbb. Фибриллярный актин окрашен красным. Ядра клеток докрашены DAPI.

ром Wt1, что указывает на ее специфическое включение в клетки мезотелия и возможность использования модели для прослеживания судьбы эпикардальных клеток.

Было выявлено, что культивирование сердца *ex vivo* в среде с добавлением PDGFbb вызывает направленную миграцию PKH26-позитивных клеток эпикарда в подлежащие слои сердечной стенки в сравнении с образцами контрольных сердец. В контрольной группе миграция PKH26-позитивных клеток практически не наблюдалась. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов сердца показало, что часть PKH26-позитивных клеток эпикарда положительно окрашивалась антителами к гладкомышечному альфа-актину (SMA), что указывает на признаки дифференцировки клеток в гладкомышечном направлении. Общее число PKH+SMA-позитивных клеток эпикарда было в 2,3 раза больше после PDGF-стимуляции, чем в контрольных сердцах, что может указывать на признаки активации эпикардального пула клеток (рис. 2, *a, b*).

approaches aimed at its stimulation. One such approach may be gene therapy using plasmids (mobile genetic elements shaped like a DNA circular molecule) encoding basic proangiogenic factors. Plasmids are safe from the point of view of mutagenesis and integration into the genome, and after injection into myocardium they are able to transfect mammalian cells, providing transient (up to 14 days) expression of a transgene, generating the gradient of vascular factors necessary for stimulation of vascular assembly.

This study demonstrated that intramyocardial injection of a genetic construct encoding PDGFbb after a myocardial infarction can stimulate vascular network repair by increasing the formation of NG2-positive arterioles and venules. These effects may be based on several mechanisms. The first is related to the well-known ability of PDGFbb to upregulate expression of VEGF (VEGF189, VEGF183, VEGF164), the key factor responsible for activation and specific differentiation of endothelial cells [6, 7]. In addition, PDGFbb stimulates the growth and differentiation of precursor endothelial cells, their subsequent mi-



Для исследования возможности стимуляции ЭМП в клетках эпикарда под действием PDGFBB были проведены эксперименты *in vitro*. Было показано, что при культивировании клеток эпикарда в стандартной среде они обладают «cobblestone» морфологией, экспрессируют маркеры Wt1, имеют низкоорганизованный цитоскелет с преимущественным распределением актиновых филаментов по периферии клетки. Добавление в среду культивирования рекомбинантного PDGFBB вызывало существенные изменения клеточной культуры (рис. 2, *c, d*). После стимуляции PDGFBB в клетках эпикарда формировались структурированные филаменты гладкомышечного альфа-актина и калпонины (рис. 2, *c, d*), которые не визуализировались при культивировании в контрольной среде. Полученные данные указывают на признаки активации ЭМП, приводящие к формированию промигранционного фенотипа и признаков дифференцировки в направлении перicyтов/гладкомышечных клеток после PDGF стимуляции.

Динамика роста заболеваний ишемической природы и ограниченность терапевтических средств таргетного воздействия стимулирует рост интереса к изучению механизмов васкуляризации и поиску новых подходов, направленных на ее стимуляцию. Одним из таких подходов может быть генная терапия с использованием плазмид (мобильных генетических элементов в виде кольцевой молекулы ДНК), кодирующих основные проангиогенные факторы. Плазмиды безопасны с позиций мутагенеза и интеграции в геном, а после введения в миокард способны трансфицировать клетки млекопитающих, обеспечивая транзиторную (до 14 дней) экспрессию трансгена, формирование градиента сосудистых факторов, что необходимо для стимуляции сборки сосудов.

В рамках данного исследования продемонстрировали, что внутримиекардиальное введение генетической конструкции, кодирующей PDGFBB, после инфаркта миокарда может стимулировать восстановление сосудистой сети за счет увеличения образования NG2-позитивных артериол и венул. В основе этих проявлений может лежать несколько механизмов. Первый из них связан с известной способностью PDGFBB индуцировать повышенную экспрессию VEGF (VEGF189, VEGF183, VEGF164) — ключевого фактора, отвечающего за активацию и спецификацию эндотелиальных клеток [6, 7]. Кроме того, PDGF стимулирует рост и дифференцировку эндотелиальных клеток-предшественниц, их последующую миграцию и адгезию, что делает его одним из ключевых игроков в «оркестре» ангиогенных ростовых факторов, действия

gration and adhesion, which makes it one of the major players in the «orchestra» of angiogenic growth factors whose actions are aimed at enhancing the microcirculatory network [16, 17]. Another, no less important mechanism of proangiogenic action of PDGFBB is the regulation of functions of smooth muscle cells and pericytes [5, 18]. Animals knocked out on PDGFBB or PDGFR genes have defects in vascular maturation due to impaired pericyte integration into the vascular wall [19], which leads to an increase in vascular permeability, swelling, and fatal bleeding in late embryogenesis [20, 21]. The introduction of neutralizing antibodies to PDGFR disrupts the migration of pericytes and their embedding in the vascular wall leading to angiogenesis disorders [22]. However, the effect of PDGF on myocardium is not limited to vascular effects only. We first discovered that PDGFBB might stimulate the epicardial pool of cardiomyocytes. During embryogenesis, the epicardium is a source of paracrine signals and a producer of smooth muscle cells, pericytes, conduction system cells, and, according to some reports, coronary endothelium and cardiomyocytes [10]. In the postnatal heart, epicardial activity is significantly reduced, but it retains the ability to reactivate and participate in post infarction reparative regeneration.

With epicardial activation *ex vivo*, PDGFBB has been shown to stimulate the formation of epicardial precursor cells, some of which express markers of smooth muscle cells/pericytes. This process is probably based on cell entry into epithelial-mesenchymal transition (EMT), which promotes the acquisition of a migratory phenotype and the ability for directed differentiation. These data are based on the results of experiments with epicardial cells *in vitro*, indicating the possibility of their entry into EMT after PDGFBB-mediated stimulation. In addition to the ability to differentiate in vascular direction, epicardial cells are able to provide angioprotective action due to production of cocktails of secreted mitogens (FGF-1, -2, -4, -6, -9 and -16, IGF-1, -2) [10, 23–25], as well as modulation of inflammatory response during the repair period [26, 27].

## Conclusion

Thus, intramyocardial injection of the genetic construct encoding PDGFBB after myocardial may have multifaceted effects on the processes of vascular network restoration. Injection of a genetically engineered preparation resulted in an increase in the number of new vessels and accumulation of vascular cells (smooth muscle cells/pericytes), which is probably due to direct mitogenic action or mediated secretion of VEGF, as well as stimulating effect on the epicardial cell pool. This suggests the prospect of using PDGFBB as a new tool to stimulate epicardium and post infarction vascularization and heart repair processes.

которых направлены на увеличение сети сосудов микроциркуляции [16, 17]. Другим, не менее важным, механизмом проангиогенного воздействия PDGFBB является регуляция функций гладкомышечных клеток и перicyтов [5, 18]. У животных, нокаутированных по генам PDGF-BB или PDGFR, наблюдаются дефекты созревания сосудов вследствие нарушения интеграции перicyтов в сосудистую стенку [19], что ведет к увеличению сосудистой проницаемости, отеков и летальных кровотечений в позднем эмбриогенезе [20, 21]. Введение нейтрализующих антител к PDGFR нарушает миграцию перicyтов и их встраивание в сосудистую стенку, что приводит к нарушению ангиогенеза [22]. Однако, действие PDGFBB на миокард не ограничивается исключительно сосудистыми эффектами. Мы впервые обнаружили, что PDGFBB может оказывать стимулирующее влияние на эпикардальный пул клеток сердца. В период эмбриогенеза эпикард служит источником паракринных сигналов и продуцентом гладкомышечных клеток, перicyтов, клеток проводящей системы, а по некоторым данным коронарного эндотелия и кардиомиоцитов [10]. В постнатальном сердце активность эпикарда существенно снижается, однако он сохраняет способность к реактивации и участию в репаративной регенерации после инфаркта.

При активации эпикарда *ex vivo* показали, что PDGFBB стимулирует образование эпикардальных клеток-предшественниц, часть из которых экспрессируют маркеры гладкомышечных клеток/перicyтов. Вероятно, в основе

такого процесса лежит вступление клеток в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), что способствует приобретению промигранционного фенотипа и способности к направленной дифференцировке. Эти данные основываются на результатах проведенных экспериментов с клетками эпикарда *in vitro*, указывающих на возможность их вступления в ЭМП после PDGFBB-опосредованной стимуляции. В дополнение к возможности дифференцировки в сосудистом направлении клетки эпикарда способны оказывать ангиопротективное действие за счет продукции коктейля секретируемых митогенов (FGF-1, -2, -4, -6, -9 и -16, IGF-1, -2) [10, 23-25], а также модуляции воспалительного ответа в период репарации [26, 27].

## Заключение

Таким образом, внутримышечное введение генетической конструкции, кодирующей PDGFBB, после инфаркта может оказывать плеотропное воздействие на процессы восстановления сосудистой сети. Введение генного препарата способствовало увеличению числа сформированных сосудов и накоплению сосудистых клеток (гладкомышечных клеток/перicyтов), что, вероятно, обусловлено прямым митогенным воздействием или опосредованным секрецией VEGF, а также стимулирующим влиянием на эпикардальный пул клеток. Это позволяет рассматривать PDGFBB в качестве нового инструмента для стимуляции эпикарда и процессов постинфарктной васкуляризации и репарации сердца.

## Литература

1. Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol.* 2020; 3. DOI: 10.1038/s41569-020-0403-y.
2. Adams R., Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis/ *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8 (6): 464–478. DOI: 10.1038/nrm2183.
3. Bergers G., Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005; 7 (4): 452–464. DOI: 10.1215/S1152851705000232.
4. Ross R., Glomset J., Kariya B., Harker L.A. Platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71 (4): 1207–1210. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1207.
5. Guo P., Hu B., Gu W. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelium and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol.* 2003; 162: 1083–1093. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63905-3.
6. Affleck D.G., Bull D.A., Bailey S.H., Albanil A., Connors R., Stringham J.C., Karwande S.V. PDGF (BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF (BB), and PDGF (AB). *J Surg Res.* 2002; 107: 203–209. DOI: 10.1006/jsre.2002.6510
7. Sato N., Beitz J., Kato J., Yamamoto M., Clark J., Calabresi P., Raymond A., Frackelton A. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am. J. Pathol.* 1993; 142: 1119–1130. PMID: 7682762
8. Folestad E., Kunath A., Wägsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Mol Aspects Med.* 2018; 62: 1–11. DOI: 10.1016/j.mam.2018.01.005.
9. Medamana J., Clark R.A., Butler J. Platelet-Derived Growth Factor in Heart Failure. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 243: 355–369. DOI: 10.1007/164\_2016\_80.
10. Дергилев К., Комова А., Поколаева З., Белоглазова И., Парфенова Е. Эпикард как новая мишень для регенеративных технологий в кардиологии. *Гены & Клетки.* 2020; 14 (2): 33–40.

## References

1. Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nat Rev Cardiol.* 2020; 3. DOI: 10.1038/s41569-020-0403-y.
2. Adams R., Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis/ *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8 (6): 464–478. DOI: 10.1038/nrm2183.
3. Bergers G., Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 2005; 7 (4): 452–464. DOI: 10.1215/S1152851705000232.
4. Ross R., Glomset J., Kariya B., Harker L.A. Platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71 (4): 1207–1210. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1207.
5. Guo P., Hu B., Gu W. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelium and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol.* 2003; 162: 1083–1093. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63905-3.
6. Affleck D.G., Bull D.A., Bailey S.H., Albanil A., Connors R., Stringham J.C., Karwande S.V. PDGF (BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF (BB), and PDGF (AB). *J Surg Res.* 2002; 107: 203–209. DOI: 10.1006/jsre.2002.6510
7. Sato N., Beitz J., Kato J., Yamamoto M., Clark J., Calabresi P., Raymond A., Frackelton A. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis *in vitro*. *Am. J. Pathol.* 1993; 142: 1119–1130. PMID: 7682762
8. Folestad E., Kunath A., Wägsäter D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Mol Aspects Med.* 2018; 62: 1–11. DOI: 10.1016/j.mam.2018.01.005.
9. Medamana J., Clark R.A., Butler J. Platelet-Derived Growth Factor in Heart Failure. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 243: 355–369. DOI: 10.1007/164\_2016\_80.
10. Dergilev K., Komova A., Tsokolaeva Z., Beloglazova I., Parfenova E. Epicardium as a New Target for Regenerative Technologies in Cardiology. *Geny & Kletki.* 2020; 14 (2): 33–40 [In Russ.] DOI: 10.23868/202004016

11. Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 692–703. DOI: 10.1007/s00018-007-6522-3
12. Olivey H.E., Svensson E.C. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ Res.* 2010; 106: 818–832. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209197
13. Дергулев К., Цоколаева З., Белоглазова И., Ратнер Е., Молокотина Ю., Парфенова Е. Характеристика ангиогенных свойств C-KIT+ — клеток миокарда. *Гены & Клетки.* 2018; 13 (3): 82–88. DOI: 10.23868/201811038
14. Cao J., Poss K.D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2018; 15 (10): 631–647. DOI: 10.1038/s41569-018-0046-4
15. Edelberg J.M., Tang, L., Hattori, K., Lyden, D., Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ. Res.* 2002 90: 89–93. DOI: 10.1161/01.res.0000020861.20064.7e
16. Wyler von Ballmoos M., Yang Z., Völzmann J., Baumgartner I., Kalka C., Di Santo S. Endothelial progenitor cells induce a phenotype shift in differentiated endothelial cells towards PDGF/PDGFRβ axis-mediated angiogenesis. *PLoS One.* 2010; 5 (11): 14107. DOI: 10.1371/journal.pone.0014107
17. Wilkinson-Berka J.L., Babic S., De Gooyer T. Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1263–1273. DOI: 10.1016/S0002-9440 (10)63214-2
18. Lindahl P., Johansson B.R., Leveen P., Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277: 242–245. DOI: 10.1126/science.277.5323.242
19. Leveen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larsson E., Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 1994; 8: 1875–1887. DOI: 10.1101/gad.8.16.1875
20. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994; 8: 1888–1896. DOI: 10.1101/gad.8.16.1888
21. Sano H., Sudo T., Yokode M. Functional blockade of platelet derived growth factor receptor-beta but not of receptor-alpha prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; 103: 2955–2960. DOI: 10.1161/01.cir.103.24.2955
22. Lavine K.J., Yu K., White A.C., Zhang X., Smith C., Partanen J., Ornitz D.M. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation *in vivo*. *Dev Cell.* 2005; 8: 85–95. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.12.002
23. Pennisi D.J., Mikawa T. Normal patterning of the coronary capillary plexus is dependent on the correct transmural gradient of FGF expression in the myocardium. *Dev Biol.* 2005; 279: 378–390. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.12.028
24. Wang K., Shen H., Gan P., Cavallero S., Kumar S.R., Lien C.L., Sucov H.M. Differential roles of insulin like growth factor 1 receptor and insulin receptor during embryonic heart development. *BMC Dev Biol.* 2019; 19: 5. DOI: 10.1186/s12861-019-0186-8
25. Ramjee V., Li D., Manderfield L.J., Liu F., Engleka K.A., Aghajanian H., Rodell C.B., Lu W., Ho V., Wang T. Epicardial YAP/TAZ orchestrate an immunosuppressive response following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2017; 127: 899–911. DOI: 10.1172/JCI88759
26. Balmer G.M., Bollini S., Dubé K.N., Martinez-Barbera J.P., Williams O., Riley P.R. Dynamic haematopoietic cell contribution to the developing and adult epicardium. *Nat Commun.* 2014; 5: 4054. DOI: 10.1038/ncomms5054
11. Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 692–703. DOI: 10.1007/s00018-007-6522-3
12. Olivey H.E., Svensson E.C. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ Res.* 2010; 106: 818–832. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209197
13. Dergilev K., Tsokolaeva Z., Beloglazova I., Ratner E., Molokotina Yu., Parfenova E. Characterization of the angiogenic properties of C-KIT+ — myocardial cells. *Geny & Kletki.* 2018; 13 (3): 82–88. [In Russ.] DOI: 10.23868/201811038
14. Cao J., Poss K.D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2018; 15 (10): 631–647. DOI: 10.1038/s41569-018-0046-4
15. Edelberg J.M., Tang, L., Hattori, K., Lyden, D., Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ. Res.* 2002 90: 89–93. DOI: 10.1161/01.res.0000020861.20064.7e
16. Wyler von Ballmoos M., Yang Z., Völzmann J., Baumgartner I., Kalka C., Di Santo S. Endothelial progenitor cells induce a phenotype shift in differentiated endothelial cells towards PDGF/PDGFRβ axis-mediated angiogenesis. *PLoS One.* 2010; 5 (11): 14107. DOI: 10.1371/journal.pone.0014107
17. Wilkinson-Berka J.L., Babic S., De Gooyer T. Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy. *Am J Pathol.* 2004; 164: 1263–1273. DOI: 10.1016/S0002-9440 (10)63214-2
18. Lindahl P., Johansson B.R., Leveen P., Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277: 242–245. DOI: 10.1126/science.277.5323.242
19. Leveen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larsson E., Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 1994; 8: 1875–1887. DOI: 10.1101/gad.8.16.1875
20. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 1994; 8: 1888–1896. DOI: 10.1101/gad.8.16.1888
21. Sano H., Sudo T., Yokode M. Functional blockade of platelet derived growth factor receptor-beta but not of receptor-alpha prevents vascular smooth muscle cell accumulation in fibrous cap lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2001; 103: 2955–2960. DOI: 10.1161/01.cir.103.24.2955
22. Lavine K.J., Yu K., White A.C., Zhang X., Smith C., Partanen J., Ornitz D.M. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation *in vivo*. *Dev Cell.* 2005; 8: 85–95. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.12.002
23. Pennisi D.J., Mikawa T. Normal patterning of the coronary capillary plexus is dependent on the correct transmural gradient of FGF expression in the myocardium. *Dev Biol.* 2005; 279: 378–390. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.12.028
24. Wang K., Shen H., Gan P., Cavallero S., Kumar S.R., Lien C.L., Sucov H.M. Differential roles of insulin like growth factor 1 receptor and insulin receptor during embryonic heart development. *BMC Dev Biol.* 2019; 19: 5. DOI: 10.1186/s12861-019-0186-8
25. Ramjee V., Li D., Manderfield L.J., Liu F., Engleka K.A., Aghajanian H., Rodell C.B., Lu W., Ho V., Wang T. Epicardial YAP/TAZ orchestrate an immunosuppressive response following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2017; 127: 899–911. DOI: 10.1172/JCI88759
26. Balmer G.M., Bollini S., Dubé K.N., Martinez-Barbera J.P., Williams O., Riley P.R. Dynamic haematopoietic cell contribution to the developing and adult epicardium. *Nat Commun.* 2014; 5: 4054. DOI: 10.1038/ncomms5054

Поступила 29.07.20

Received 29.07.20