

## Эпикардальная трансплантация пластов из мезенхимальных стромальных клеток жировой клетчатки способствует активации эпикарда и стимулирует ангиогенез при инфаркте миокарда (экспериментальное исследование)

К. В. Дергилев<sup>1</sup>, З. И. Цоколаева<sup>1</sup>, И. Б. Белоглазова<sup>1</sup>, А. В. Комова<sup>1</sup>,  
С. В. Павлова<sup>2,3,4</sup>, Д. О. Трактеев<sup>5</sup>, Е. В. Парфенова<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава России, Россия, г. Москва,

<sup>2</sup> Институт цитологии и генетики Федерального исследовательского центра СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 10

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630000, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8

<sup>4</sup> Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. академика Е. Н. Мешалкина Минздрава России, Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, д. 15, к. 1

<sup>5</sup> Центр регенеративной медицины, Медицинское отделение, Медицинский колледж, Университет Флориды, США, Флорида 32610, Гейнсвилл, M421, 1600 SW Арчер рд.

<sup>6</sup> Факультет Фундаментальной медицины, Московский Государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31-5

## Epicardial Transplantation of Adipose Mesenchymal Stromal Cell Sheets Promotes Epicardial Activation and Stimulates Angiogenesis in Myocardial Infarction (Experimental Study)

Konstantin V. Dergilev<sup>1</sup>, Zoya I. Tsokolaeva<sup>1</sup>, Irina B. Beloglazova<sup>1</sup>, Anastasia V. Komova<sup>1</sup>,  
Sofia V. Pavlova<sup>2,3,4</sup>, Dmitry O. Traktuev<sup>5</sup>, Yelena V. Parfyonova<sup>1,6</sup>

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

<sup>2</sup> Institute of Cytology and Genetics, Federal Research Center, Siberian Branch of RAS 10 Academic Lavrentiev Pr., 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Chemical Biology and Fundamental Medicine Institute, Siberian Branch of RAS 8 Academic Lavrentiev Pr., 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> E. N. Meshalkin Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health of Russia 15, 1 Rechkunovskaya Str., 630055 Novosibirsk, Russia

<sup>5</sup> Center for Regenerative Medicine, Department of Medicine, College of Medicine, University of Florida, 1600 SW Archer Rd, M421 Gainesville, FL 32610 USA

<sup>6</sup> Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, 31-5 Lomonosovsky Avenue, Moscow 119192, Russia

**Цель исследования:** оценить влияние трансплантации тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе пластов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при инфаркте миокарда на активацию эпикардального пула клеток и васкуляризацию зоны повреждения.

**Материалы и методы.** МСК получили из образцов подкожной жировой клетчатки крыс линии Wistar и мышей линии C57Bl/6. ТИК получили путем культивирования пластов клеток на чашках с термочувствительным покрытием (Nunc Dishes with UpCell Surface). Трансплантацию ТИК проводили после моделирования инфаркта миокарда у крысы путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии. Оценка состояния клеток трансплантата и зоны повреждения проводили с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов миокарда. Для оценки влияния продуктов секреции МСК на миграционную активность клеток эпикарда *in vitro* использовали метод эксплантной культуры.

**Результаты.** МСК в составе ТИК после трансплантации сохраняют жизнеспособность и вызывают активацию эпикардального пула клеток и локальное повышение васкуляризации зоны повреждения. Эксперименты *in vitro* показали, что кондиционированная среда МСК оказывает стимулирующее воздействие на миграционную активность клеток эпикарда и вызывает образование активированных Wt1/POD1 клеток-предшественниц.

Адресс для корреспонденции:

Константин Владимирович Дергилев  
E-mail: doctorkote@gmail.com

Correspondence to:

Konstantin V. Dergilev  
E-mail: doctorkote@gmail.com

**Заключение.** Трансплантация ТИК на основе пластов МСК представляется рациональным подходом для эффективной доставки жизнеспособных клеток в миокард с целью активирующего воздействия на эпикардальную клеточную нишу и репаративный ангиогенез.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки; инфаркт миокарда; эпикард; васкуляризация; тканеинженерная конструкция; пласт клеток

**Aim:** to evaluate the impact of tissue-engineered structures (TES) transplantation based on mesenchymal stromal cell (MSC) sheets in myocardial infarction on the activation of the epicardial cell pool and vascularization of the damaged zone.

**Materials and methods.** Mesenchymal stromal cells were obtained from samples of subcutaneous fat of Wistar rats and C57Bl/6 mice. Tissue engineering structures were obtained by culturing cell sheets on thermosensitive plates (Nunc Dishes with UpCell Surface). Transplantation of TESs was performed after myocardial infarction modeling in rats by ligation of the anterior descending coronary artery. Transplant cells and damaged zones were assessed using immunofluorescent staining of myocardial cryosections. The impact of MSC secretion products on the migration activity of epicardial cells *in vitro* was evaluated using the explant culture method.

**Results.** MSCs in TESs after transplantation remain viable and induce activation of the epicardial cell pool and local increase of the damaged zone vascularization. The *in vitro* experiments showed that the conditioned environment of MSCs stimulates the migratory activity of epicardial cells and initiates the formation of activated Wt1/POD1 precursor cells.

**Conclusion.** TES transplantation on the basis of MSC sheets seems to be a promising approach for effective delivery of viable cells into myocardium to activate the epicardial cellular niche and reparative angiogenesis.

**Keywords:** mesenchymal stem cells; myocardial infarction; epicardium; vascularization; tissue-engineered cellular structure; cellular sheet

DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-38-49

## Введение

Высокоэффективные процессы репаративной регенерации миокарда характерны для низших позвоночных и рыб, крайне слабо представлены у млекопитающих, что не позволяет миокарду полноценно восстанавливаться при обширных повреждениях и лежит в основе развития многих кардиологических заболеваний. Современная медицина не имеет в своем арсенале средств, позволяющих восстановить утраченные в результате патологических процессов клетки сердца. Решение этой проблемы лежит в области раскрытия эндогенных механизмов, регулирующих процессы репаративной регенерации в сердце, и создания на этой основе новых технологий для их стимуляции. В последние годы значительное внимание исследователей привлекает эпикард и его роль в репарации миокарда после инфаркта. Показано, что клетки мезотелия эпикарда активируются под действием сигналов из поврежденного миокарда, вступают в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), а образующиеся мезенхимальные прогениторные клетки эпикарда мезенхимального фенотипа дифференцируются в гладкомышечные клетки и перicytes сосудов, способствуя восстановлению васкуляризации, а также в фибробласты, участвующие в формировании рубца [1]. Помимо этого, участие эпикарда в репарации сердца осуществляется посредством паракринных влияний, в частности, секреции факторов роста, прежде всего,

## Introduction

Highly effective reparative myocardial regeneration, typical for lower vertebrates and fish, is extremely poorly represented in mammals, which does not allow the myocardium to fully recover from extensive damage and underlies various heart diseases. Nowadays, contemporary medicine does not possess the necessary tools to restore the heart cells lost due to pathological processes. The problem solution lies in the discovery of endogenous mechanisms regulating the reparative regeneration in the heart and creation of new technologies for their stimulation.

In recent years, the epicardium and its role in myocardial repair after infarction have attracted considerable attention. The epicardial mesothelial cells were shown to be activated by signals from the damaged myocardium, enter the epithelial-mesenchymal transition (EMT), while the resulting mesenchymal progenitor epicardial cells of the mesenchymal phenotype differentiated into smooth muscle cells and vascular pericytes, promoting restored vascularization, as well as into fibroblasts involved in the scar formation [1]. In addition, the epicardium participates in cardiac repair through paracrine effects, in particular, the secretion of growth factors, primarily FGF, and follistatin-like protein-1, which suppresses apoptosis of cardiomyocytes and stimulates their proliferation [2]. In this context, the search for ways to stimulate epicardial activation seems to be a promising strategy for promoting endogenous reparation and re-

FGF, и фоллистатин подобного белка — 1, подавляющего апоптоз кардиомиоцитов и стимулирующего их пролиферацию [2]. В связи с этой ролью эпикарда поиск способов стимуляции его активации представляется перспективной стратегией стимуляции эндогенных репаративных и регенеративных процессов в сердце. В этом направлении особый интерес представляет изучение эффектов локальной эпикардимальной трансплантации простейших тканеинженерных конструкций, состоящих из пластов клеток (англ. *cell sheets*) — своеобразных «клеточных заплаток», состоящих из многослойных клеточных структур в комплексе с наработанным ими же внеклеточным матриксом. Клетки после трансплантации в виде таких конструкций сохраняют жизнеспособность и за счет паракринной активности и высвобождения внеклеточных везикул моделируют микроокружение и генерируют сигналы, активирующие регенеративную программу в окружающих клетках. Наши ранние исследования и работы других научных групп показали безопасность такого вида клеточной терапии, возможность полной интеграции имплантата в ткань сердца, обеспечение длительной жизнеспособности клеток и положительное влияние на репаративные процессы в постинфарктном сердце [3–5]. Однако механизм такого терапевтического воздействия остается малоизученным. Нами было выдвинуто предположение, что трансплантация пластов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) жировой ткани на поверхность сердца может активировать пул эпикардимальных клеток-предшественниц, которые путем вступления в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и последующей дифференцировки, а также с помощью паракринных механизмов участвуют в репаративных процессах.

Цель исследования — оценить влияние трансплантации тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе пластов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при инфаркте миокарда на активацию эпикардимального пула клеток и васкуляризацию зоны повреждения.

## Материал и методы

**Выделение и культивирование МСК жировой клетчатки крысы и мыши.** МСК крысы были выделены из образцов подкожной жировой клетчатки крысы линии Wistar возрастом 12 недель в соответствии с методом, описанном ранее [3]. Жировую ткань измельчали до размера 1–2 мм и обрабатывали раствором коллагеназы I (200 ед/мл), («Sigma», США) и диспазы (30 ед/мл), («Thermo Fisher Scientific Inc», США) в течение 1 часа при 37°C, затем центрифугировали при 200 g, 10 минут, осажденные клетки ресуспендировали и пропускали через нейлоновое сито («BD Bioscience», США) с диаметром пор 40 мкм. Профильтрованную суспензию центрифугировали

generation in the myocardium. In this area, studying the effects of local epicardial transplantation of elementary tissue-engineered structures composed of cell sheets, a kind of «cell patch» consisting of multilayer cell structures in combination with the extracellular matrix produced by them, is of particular interest. Cells embedded into this structure after transplantation remain viable and due to paracrine activity and release of extracellular vesicles model microenvironment and generate signals activating the regeneration program in adjacent cells. Our early studies and the works of other scientific groups have shown the safety of this type of cell therapy, their complete integration into the heart tissue, ensuring the long-term viability of cells and a positive impact on reparation in the post-infarction myocardium [3–5]. However, the mechanism of this therapeutic effect remains poorly understood. We have suggested that the transplantation of mesenchymal stromal cells (MSCs) sheets from adipose tissue to the heart surface may activate a pool of epicardial precursor cells participating in reparation by entering the epithelial-mesenchymal transition (EMT) with further differentiation, as well as through paracrine mechanisms.

This study aimed at assessment of impact of tissue engineering structures (TES) based on mesenchymal stromal cell (MSC) sheets transplantation in myocardial infarction on activation of the epicardial cell pool and the vascularization of the damaged area.

## Materials and Methods

**Separation and cultivation of MSCs of subcutaneous fatty tissue in rats and mice.** The MSCs in 12-week Wistar rats were isolated from samples of subcutaneous fatty tissue in accordance with the previously described technique [3]. The fatty tissue was crushed to particles sized 1–2 mm and then treated with collagenase I solution (200 units/ml) («Sigma», Thermo Fisher Scientific Inc. (USA)) for 1 hour at 37°C, then centrifuged at 200 g for 10 minutes, with the precipitated cells resuspended and passed through a nylon sieve (BD Bioscience, USA) with a pore diameter of 40 µm. A filtered suspension was centrifuged at 200g for 10 min. Cellular precipitate was resuspended in an adipose MSC growth medium DMEM-F12 («Gibco», USA)/10% CFS (calf fetal serum) («ATCC», USA), then placed on Petri dishes and cultured under standard conditions (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). The next day, loose cells and red blood cells were washed and the medium was replaced. Then, the medium was changed every 2–3 days. Upon reaching 70% of the monolayer, the cells were split 1:3 using 0.05% trypsin solution/0.02% EDTA (PanEco, Russia). The cells used in the experiments were not older than 4 passages. A culture of adipose MSCs from mice C57BL/6 was obtained using a similar protocol.

**Obtaining a conditioned MSC medium.** Murine MSCs (3<sup>rd</sup> passage, 2×10<sup>6</sup> cells/plate) were transferred and aliquoted in 2 plates with an area of 55 cm<sup>2</sup> in DMEM



при 200 g, 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в среде для культивирования мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани DMEM-F12 («Gibco», США)/10% ФТС (фетальная сыворотка теленка), («ATCC», США), высаживали на культуральные чашки Петри и культивировали в стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). На следующий день отмывали не прикрепившиеся клетки и эритроциты, среду заменяли на свежую. Далее, проводили смену среды каждые 2–3 дня. При достижении 70% монослоя клетки рассаживали в соотношении 1:3 с использованием 0,05% раствора трипсина/0,02% ЭДТА («ПанЭко», Россия). В экспериментах использовали клетки не старше 4 пассажа. Получение культуры МСК жировой ткани мыши линии C57BL/6 проводили по сходному протоколу.

**Получение кондиционированной среды МСК.** МСК мыши 3-го пассажа (2×10<sup>6</sup> клеток/чашку) высаживали на 2 культуральные чашки площадью 55 см<sup>2</sup> в среду DMEM («Invitrogen», США), содержащей 10% ФТС, по 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2 мМ L-глутамина. На следующий день чашки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и добавляли по 10 мл среды DMEM («Invitrogen») без добавок. Далее, первую чашку инкубировали в условиях нормоксии (21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), в вторую в условиях гипоксии (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) при 37°C в течение 48 часов. Затем профильтрованную среду центрифугировали при 300 g в течение 10 мин и хранили при –70°C.

**Исследования влияния кондиционированной среды МСК на миграцию эпикардиальных клеток из эксплантов.** Сердце неонатальной мыши C57BL/6 (2 дня после рождения) иссекали, измельчали с помощью скальпеля под контролем микроскопа до размера кусочков 2 мм и высаживали (эпикардиальным слоем к поверхности) на культуральные чашки, покрытые 1% желатином в одну из нижеуказанных сред: а) контрольная среда (DMEM («Invitrogen») без добавок); б) среда МСК, предкультивированных в условиях гипоксии; в) среда МСК, предкультивированных в условиях нормоксии. Культивирование эксплантной культуры проводили в течение 72 часов. Фиксацию изображений проводили с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия), количественный подсчет клеток эпикарда выполнялся с помощью программы Image J software («National Institute of health», США).

**Характеристика иммунофенотипа эпикардиальных клеток *in vitro*.** Анализ иммунофенотипа клеток эксплантной культуры проводили с помощью иммуноцитохимии. Клетки окрашивали антителами к маркерам Wt1 («Abcam», США), POD1 («Santa Cruz», США), бета катенин («Abcam», США) в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с AlexaFluor488 («Invitrogen», США, 1:800, 1 ч при 37°C). Для визуализации актинового цитоскелета проводили дополнительное окрашивание фаллоидином, конъюгированным с красителем Alexa Fluor™ 594 («Thermo Fisher Scientific Inc», США, 1:200, 20 минут при 37°C). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride («Sigma», США).

**Получение ТИК на основе пластов МСК.** Для получения клеточных пластов МСК высеивали в тер-

(«Invitrogen», USA), containing 10% calf fetal serum (CFS), 100 U/ml of penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine. The next day, the plates were washed twice with phosphate buffered saline (PBS), and 10 ml of DMEM («Invitrogen») were added without any additives. Then, the first plate was incubated in normoxia (21% O<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>), the second one was incubated in hypoxia (1% O<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) at 37°C for 48 hours. Then the filtered medium was centrifuged at 300 g for 10 min and stored at -70°C.

**Influence of the conditioned MSC medium on migration of epicardial cells from explants.** The hearts of neonatal mice C57BL/6 (2 days after birth) was dissected and minced with a scalpel under the microscope to pieces sized 2 mm and seeded (with the epicardial layer facing surface) on plates pre-covered with 1% gelatin in one of the following media: a) control medium (DMEM («Invitrogen») without additives); b) medium harvested from MSCs pre-cultivated in hypoxia condition; c) medium of MSCs pre-cultivated in normoxia. The explant culture was cultivated for 72 hours. Images were obtained using the Zeiss Axiovert 200 M microscope («Carl Zeiss», Germany), and the quantitative calculation of epicardial cells was done using the ImageJ software («National Institutes of Health», USA).

**In vitro characteristics of the epicardial cell immunophenotype.** Immunophenotype analysis of explant culture cells was performed by immunocytochemistry. The cells were stained with antibodies to Wt1 («Abcam», USA), POD1 («Santa Cruz», USA) and beta catenin («Abcam», USA) markers for 1 hour, then washed and stained with secondary antibodies conjugated with AlexaFluor 488 («Invitrogen», USA, 1: 800, 1 h at 37°C). To visualize the actin cytoskeleton, additional staining with Alexa Fluor™ 594 dye-conjugated phalloidin was performed (Thermo Fisher Scientific Inc, USA, 1:200, 20 minutes at 37°C). Cell nuclei were stained with DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) («Sigma», USA).

**Obtaining TESs from MSC sheets.** In order to obtain cellular sheets, MSCs were seeded into heat-sensitive plates (300,000 cells/cm<sup>2</sup>) Nunc Dishes with UpCell Surface («Thermo Scientific», USA). MSCs were pre-methylated with fluorescent membrane dye (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling dye («Sigma», USA). The cells were cultivated for 72 h in the DMEM/F12 medium (Invitrogen, USA) containing 10% CFS, 100 U/ml penicillin and streptomycin, 2 mM L-glutamine. To detach the cellular sheets, the plates were placed on a refrigerant and incubated at room temperature. Cellular sheets were transferred using a low-adhesion membrane («Thermo Scientific», USA).

**The characteristics of cell sheets based on MSCs.** Frozen TES cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (20 minutes at 37°C) and washed with a PBS. Myocardial sections were blocked with a solution containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 10% donor serum of second antibodies in PBS (30 min). After that, the cryosections were stained with antibodies to Ki-67 markers (Abcam, USA), cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, USA), and connexin 43 (ThermoFisher Scientific, USA), collagen I («Bio-Rad», USA), fibronectin («Abcam», USA) for 1 hour, then were washed and stained with antibodies conjugated with Alexa Fluor™ 488 («Invitrogen», USA, 1:800, 1 h at 37°C). The cell nuclei were stained with DAPI. Estimation of the number of nuclei per unit of area, diameter and thickness of TESs was

мочувствительные культуральные чашки (300 000 клеток/см<sup>2</sup>) Nunc Dishes with UpCell Surface («Thermo Scientific», США). Предварительно МСК метили флуоресцентным мембранным красителем (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling dye («Sigma», США)). Клетки культивировали в течение 72 ч в среде DMEM/F12 («Invitrogen», США), содержащей 10% ФТС, по 100 Ед/мл пенициллина и стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Для открепления клеточных пластов культуральные чашки помещали на хладагент и инкубировали при комнатной температуре. Перенос клеточных пластов осуществляли с помощью низкоадгезионной мембраны («Thermo Scientific», США).

**Характеристика пластов клеток на основе МСК.** Замороженные криосрезы ТИК фиксировали 3,7% параформальдегидом (20 минут при 37°C) и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). 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 Ki-67 («Abcam», США), активированной каспазе-3 (cleaved caspase-3), («Cell signaling», США), коннексину 43 («ThermoFisher Scientific», USA), коллагену I («Bio-Rad», USA), фибронектину («Abcam», USA) в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor™ 488 («Invitrogen», США, 1:800, 1 ч при 37°C). Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI. Оценку количества ядер на единицу площади, диаметра и толщины ТИК проводили с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 («Carl Zeiss», Германия).

**Моделирование инфаркта миокарда (ИМ) и трансплантация ТИК.** Эксперименты по трансплантации ТИК проводили на самцах крыс линии Wistar, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Россия). Эвтаназию крыс проводили после ингаляционной наркотизации Изофлораном методом дислокации шейного отдела позвоночника. Все необходимые манипуляции выполняли в соответствии с Директивой ЕС 2010/63 / ЕС по экспериментам на животных и были одобрены этическим комитетом института (Национальный центр медицинских исследований кардиологии, разрешение № 385.06.2009). Инфаркт миокарда был индуцирован путем перевязки передней нисходящей коронарной артерии у крыс Wistar с помощью способа, описанного ранее [6]. Экспериментальных животных разделили на 2 группы: 1) контрольная группа; 2) группа эпикардальной трансплантации ТИК. Для последующей оценки пролиферативной активности клеток в составе трансплантированной ТИК использовали раствор БРДУ (бромдезоксифуридина) в ФСБ (10 мг/мл), который вводили интраперитонеально (200 мкл, 1 раз в сутки). Эвтаназию животных выполнили через 5 дней после трансплантации клеточных пластов.

**Гистологическая оценка состояния клеток трансплантата и васкуляризации.** Замороженные криосрезы миокарда фиксировали 3,7% параформальдегидом (20 минут при 37°C) и промывали ФСБ. Срезы миокарда блокировали раствором, содержащим 1% БСА, 10% сыворотки донора вторых антител

done using the Zeiss Axiovert 200 M microscope («Carl Zeiss», Germany) and Axiovision 3.1 software («Carl Zeiss», Germany).

**Myocardial infarction (MI) modelling and TES transplantation.** TES transplantation experiments were carried out on male Wistar rats purchased in the laboratory animal nursery «Pushchino» (Pushchino, Russia). The rats were euthanized after Isoflurane inhaled anesthesia by cervical spine dislocation. All the necessary manipulations were performed in accordance with the EU Directive 2010/63/EU on animal experimentation and were approved by the Institute's Ethical Committee (National Center for Cardiology Medical Research, Resolution No. 385.06.2009). Myocardial infarction was induced by ligating the anterior descending coronary artery in Wistar rats using the technique described earlier [6]. The experimental animals were divided into 2 groups: 1) control group; 2) epicardial TES transplantation group. For further evaluation of the cell proliferation in the transplanted TES, a BDU (bromodeoxyuridine) solution in PBS (10 mg/ml) was used, which was injected intraperitoneally (200 µl, once a day). The animals were euthanized 5 days after the cell sheet transplantation.

**Histological assessment of transplant cells and vascularization.** Frozen myocardial cryosections were fixed with 3.7% paraformaldehyde (20 minutes at 37°C) and washed by FSB. Myocardial sections were blocked with a solution containing 1% BSA and 10% serum of the second antibody donor in PBS (30 min). The cryosections were then stained with antibodies to BDU markers (R&D, USA), Ki-67 (Abcam, USA), Wt1 (Abcam, USA), Pecam (CD31) (Becton Dickinson, USA) for 1 hour, then washed and stained with antibodies conjugated with Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen, USA, 1:800, 1 h at 37°C).

Vascular network density analysis under the TES transplant area was performed by counting CD31-positive structures. The data were presented as the number of vessels per vision field.

**Microscopy and image analysis.** Myocardial cells and cryosections were studied using the Zeiss Axiovert 200 M fluorescent microscope («Carl Zeiss», Germany) and Axiovision 3.1 software («Carl Zeiss», Germany).

**Statistical data analysis.** Data were presented as average ± SD. Statistical significance was assessed using the Mann–Whitney test and Statistica 8.0 software package (Statsoft, USA).

## Results and Discussion

Cell integration and survival after transplantation are the key factors ensuring cellular function and reparation, which determines the efficacy of cell therapy. To deliver these characteristics, cell sheet-like structures have been developed consisting of cell sheets in combination with the extracellular matrix proteins they produce (Fig. 1). The sheets showed a high level of cell compactization (722±198 cells/ 100 µm<sup>2</sup>), which corresponds to the cell organization density within the native/intact myocardium (502±112 cells/100 µm<sup>2</sup>). The structure was a multilayer system consisting of 11–14 layers of cells interacting through connexin-43 containing gap junctions and surrounded by extracellular matrix proteins (collagen I and fibronectin).



в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркерам БРДУ («R&D», США), Ki-67 («Abcam», США), Wt1 («Abcam», США), Pecam (CD31) («Becton Dickinson», США), в течение 1 часа, затем промывали и окрашивали антителами, конъюгированными с Alexa Fluor™ 488 («Invitrogen», США, 1: 800, 1 ч при 37°C).

Анализ плотности сосудистой сети под областью трансплантации ТИК проводили путем подсчета CD31-позитивных структур. Данные представили в формате количество сосудов в поле зрения.

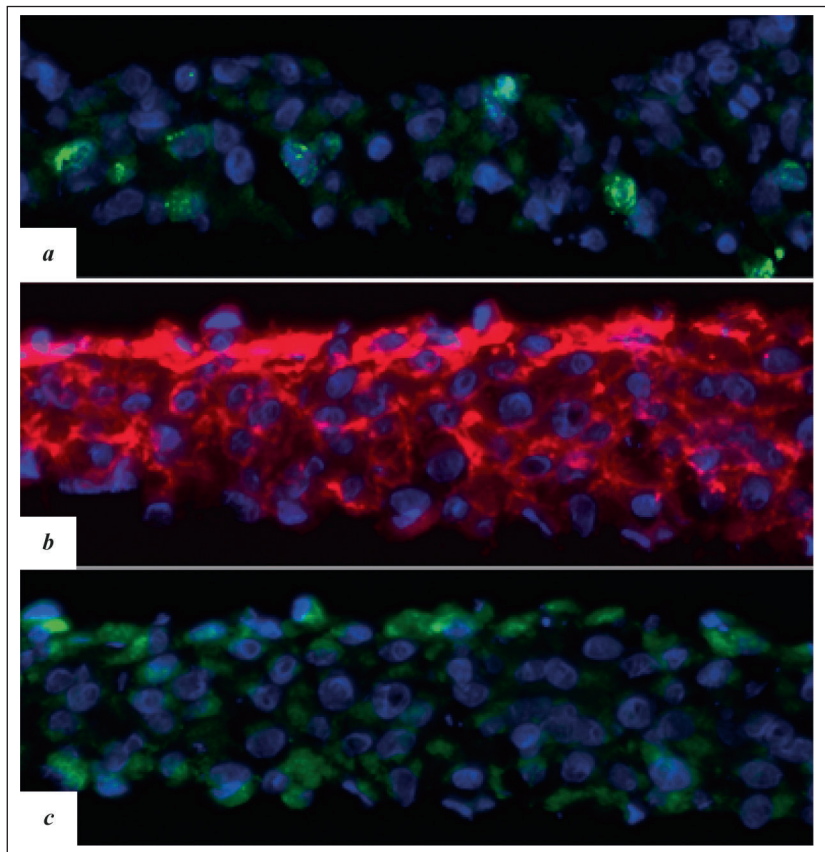
**Микроскопия и анализ изображений.** Анализ клеток и криосрезов миокарда проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss Axiovert 200 M («Carl Zeiss», Германия) и программного обеспечения Axiovision 3.1 («Carl Zeiss», Германия).

**Статистический анализ данных.** Данные представили в формате среднее  $\pm$  SD. Статистическую оценку достоверности различий проводили с использованием теста Манна-Уитни и программного пакета Statistica 8.0 («Statsoft», США).

## Результаты и обсуждение

Интеграция, выживаемость клеток после трансплантации является ключевыми факторами, обеспечивающими функционирование клеток, выполнение репаративных функций, что определяет эффективность клеточной терапии. Для обеспечения этих характеристик были разработаны конструкции (по типу «cell sheet»), состоящие из пластов клеток в комбинации с белками внеклеточного матрикса, который они нарабатывают (рис. 1). Показали, что в составе пластов отмечается высокий уровень компактизации клеток ( $722 \pm 198$  клеток/  $100 \text{ мкм}^2$ ), который соотносится с плотностью организации клеток в составе нативного/неповрежденного миокарда ( $502 \pm 112$  клеток/ $100 \text{ мкм}^2$ ). Конструкция представляла собой многослойную структуру, состоящую из 11–14 слоев клеток, взаимодействующих через коннексин-43 содержащие щелевые контакты и окруженные белками внеклеточного матрикса (коллаген I и фибронектин). Средний диаметр сформированного пласта составлял  $1,25 \pm 0,09$  см, а толщина —  $94,4 \pm 12$  мкм.

Трансплантация сформированной конструкции после ИМ приводило к ее адгезии к наружной эпикардальной поверхности сердца и интеграции в ткань миокарда (рис. 2). Пока-



**Рис. 1. Характеристика клеточных пластов на основе МСК.**

**Fig. 1. Features of MSC-based cell sheets.**

**Note.** The representative images of cellular sheet sections stained with antibodies to Ki67 (a, green) proliferation markers and extracellular matrix proteins such as fibronectin (b, red) and collagen 1 (c, green). Cell nuclei are stained with DAPI.

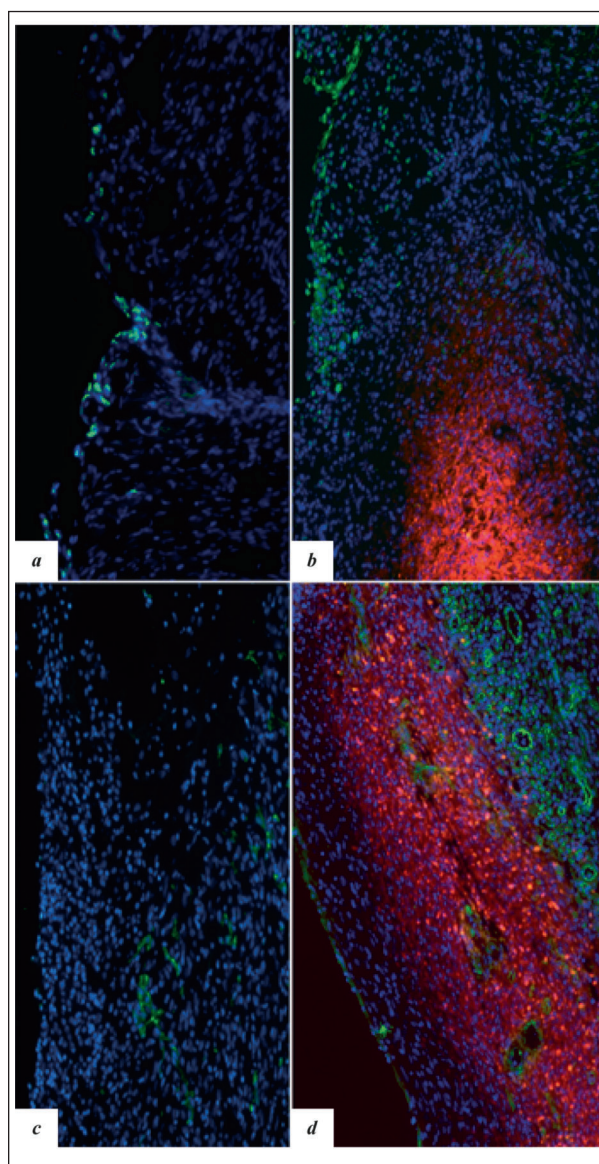
**Примечание.** Репрезентативные изображения окрашивания срезов пластов клеток антителами к маркерам пролиферации Ki67 (a, зеленый), белкам внеклеточного матрикса: фибронектин (b, красный) и коллаген 1 (c, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI.

The average diameter of the resulting sheet was  $1.25 \pm 0.09$  cm, and its thickness was  $94.4 \pm 12 \text{ }\mu\text{m}$ .

Transplantation of the elaborated structure after MI resulted in its adhesion to the external epicardial surface of the heart and its integration into the myocardial tissue (Fig. 2). The cells in the structure were shown to remain viable, as evidenced by the positive staining for BDU and Ki67 markers. In 5 days after the transplantation, there was a significant increase in the thickness of the subepicardial layer including Wt1+ cells consistent with the activated epicardial cells. Quantitative analysis showed that the average number of Wt1+ cells and their distribution area in the myocardium was significantly higher in the transplantation group in comparison with the control group ( $192 \pm 82$  and  $43 \pm 36$  cells per vision field;  $191.822 \pm 21.346$  vs  $45.117 \pm 30.812 \text{ }\mu\text{m}^2$  ( $P < 0.05$ ), respectively). In addition, the length of the «cellular pathway» from the external heart surface to the localization zone of Wt1 cells in the cell sheet transplantation group was significantly longer than in the control group, which indicates a more significant cell migratory activity in the underlying my-

зали, что клетки в составе конструкции сохраняют жизнеспособность, о чем свидетельствовало положительное окрашивание на маркеры БРДУ и Ki67. Обнаружили, что через 5 дней после трансплантации отмечалось значительное увеличение толщины субэпикардального слоя, в составе которого располагались Wt1+ клетки, характеризующие активированные клетки эпикарда. Количественный анализ показал, среднее количество Wt1+ клеток, а также площадь их распределения в миокарде была значительно выше в группе трансплантации, в сравнении с контрольной группой ( $192 \pm 82$  и  $43 \pm 36$  клеток в поле зрения;  $191822 \pm 21346$  и  $45117 \pm 30812$   $\mu\text{m}^2$  ( $p < 0,05$ ), соответственно). Кроме того, длина «клеточного пути» от наружной поверхности сердца до зоны локализации Wt1 клеток в группе с трансплантацией клеточных пластов была значительно больше, чем в контроле, что указывает на более выраженную миграционную активность клеток в подлежащие слои миокарда ( $212 \pm 39$  и  $53 \pm 34$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0,05$ ), соответственно). Учитывая наличие признаков активации клеток эпикарда после трансплантации клеточных пластов, провели исследования *in vitro* для оценки влияния продуктов секреции МСК на миграционную активность эпикардальных прогениторных клеток. Выявили, что воздействие среды культивирования МСК существенно увеличивало количество образованных эпикардальных клеток и их миграционную активность (рис. 3). Статистически значимых различий по числу клеток эксплантной культуры, образованных под действием среды МСК, культивированных в нормоксических и гипоксических условиях, не выявили. Клетки экспланта имели «cobblestone» морфологию и характеризовались экспрессией транскрипционных факторов (Wt1 и POD1) — маркеров активации клеток эпикарда, что указывало на их эпикардальную принадлежность. Обращало внимание то, что при культивировании в среде МСК часть клеток эпикарда, расположенных по периферии, приобретала веретенообразную форму, что косвенно может свидетельствовать об их вступлении в ЭМП и приобретении мезенхимального фенотипа.

Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов миокарда показало, что к 5 дню после инфаркта отмечается интенсивное образование капилляров и артериол (рис. 2 *c, d*), как в зоне некроза, так и в перинфарктных областях. Кроме того, обнаружили выраженную васкуляризацию трансплантированного клеточного графта, который содержал сосуды разного калибра. При этом мы не выявили со-локализации флуоресцентного красителя РКН26 и маркера эндотелия Ресам, что указы-



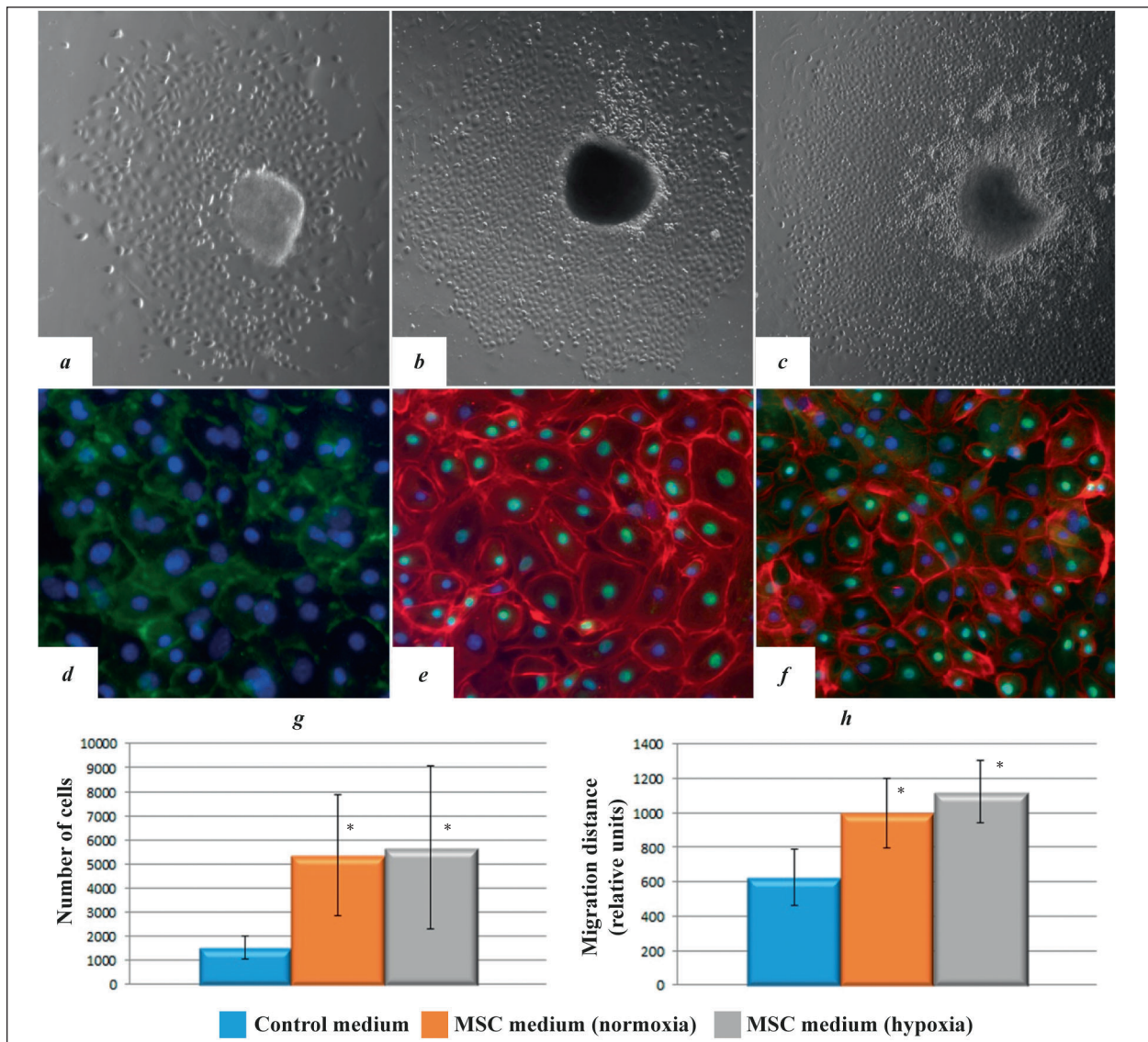
**Рис. 2.** Активация Wt1+ клеток и ангиогенеза после инфаркта миокарда после трансплантации клеточных пластов на основе МСК и в контрольных сердцах.

**Fig. 2.** Activation of Wt1+ cells and angiogenesis after myocardial infarction after MSC-based cell sheet transplantation and in the control group.

**Note.** Immunofluorescent staining of myocardium with antibodies to the marker of activated Wt1 epicardial cells in control samples (*a*) and after cell sheet transplantation (*b*). The transplanted cells in the sheets were marked with fluorescent dye PKH26 (*b*, red); immunofluorescent staining of myocardial tissue with antibodies to CD31 vascular marker in control samples (*c*) and after cell sheet transplantation (*d*). The transplanted cells in the sheets are marked with fluorescent dye PKH26 (*d*, red); cell nuclei are stained with DAPI.

**Примечание.** Иммунофлуоресцентное окрашивание ткани сердца антителами к маркеру активированных эпикардальных клеток Wt1 в контрольных образцах (*a*) и после трансплантации клеточного пласта (*b*). Трансплантированные клетки в составе пластов помечены флуоресцентным красителем РКН26 (*b*, красный); иммунофлуоресцентное окрашивание ткани миокарда антителами к маркеру сосудов CD31 в контрольных образцах (*c*) и после трансплантации клеточного пласта (*d*). Трансплантированные клетки в составе пластов помечены флуоресцентным красителем РКН26 (*d*, красный); Ядра клеток окрашены DAPI.





**Рис. 3. Миграция эпикардиальных клеток в эксплантной культуре под действием контрольной среды и кондиционированных сред МСК.**

**Fig. 3. Migration of epicardial cells in an explant culture after exposure to the control medium and conditioned MSC media.**

**Note.** Migration of epicardial cells from explants: *a* — when grown in a control medium; *b* — when exposed to the medium of MSCs grown in normoxia; *c* — when exposed to the medium of MSCs grown in hypoxia; *d, e, f* — representative images of immunofluorescent staining of epicardial cells with antibodies to beta-catenin (*d*, green), Wt1 (*e*, green), POD1 (*f*, green), fibrillary actin (*e* and *f*, red) markers. Cell nuclei are stained with DAPI. Assessment of the migrating epicardial cells number (*g*) and the migration distance (*h*) when grown in control medium and conditioned MSC media. \* — differences are statistically significant in comparison with the control,  $P < 0.05$ .

**Примечание.** Миграция эпикардиальных клеток из эксплантов: *a* — при культивировании в контрольной среде; *b* — при воздействии среды МСК, культивированных в условиях нормоксии; *c* — при воздействии среды МСК, культивированных в условиях гипоксии; *d, e, f* — репрезентативные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания клеток эпикарда антителами к маркерам: бета-катенин (*d*, зеленый), Wt1 (*e*, зеленый), POD1 (*f*, зеленый), фибриллярный актин (*e* и *f*, красный). Ядра клеток окрашены DAPI. Анализ количества мигрирующих клеток эпикарда (*g*) и длины миграционного пути (*h*) при культивировании в контрольной среде и кондиционированных средах МСК. Number of cells — число клеток; — среда; control — контрольная; MSC — МСК; normoxia — нормоксия; hypoxia — гипоксия; migration distance (relative units) — расстояние миграции (относительные единицы). \* — статистически достоверные различия по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

ваит на формирование сосудов исключительно на основе эндогенных эндотелиальных клеток. Более того, обнаружили увеличение количества сосудов под трансплантированным графтом, в сравнении с контрольными образцами ( $456 \pm 69$  и  $303 \pm 58$  сосудов в поле зрения ( $p < 0,05$ ), соответственно), причем сосуды также были образованы исключительно клетками животного-реципиента (без флуоресцентной метки).

ocardial layers ( $212 \pm 39$  vs  $53 \pm 34 \mu\text{m}$  ( $P < 0.05$ ), respectively). Since epicardial cells showed signs of activation after cellular sheet transplantation, *in vitro* studies were performed to evaluate the effect of MSC secretion products on the migration activity of epicardial progenitor cells. Exposure to MSC growth medium was found to significantly increase the number of newly produced epicardial cells and their migration activity (Fig. 3). No statistically sig-



Острое нарушение коронарного кровообращения вызывает гибель не только значительного количества кардиомиоцитов, но и эпителиоподобных клеток мезотелия, которые образуют наружный слой сердца — эпикард. Клетки эпикарда играют ключевую роль в период эмбриогенеза в развитии миокарда, коронарных артерий, проводящей системы, клапанов сердца [7–10], а также являются клеточными регуляторами восстановительных процессов в сердце после инфаркта. В нормальном состоянии эпикард представлен тонким слоем мезотелия, клетки которого находятся в состоянии покоя. При повреждении миокарда происходит реактивации эмбриональной программы экспрессии генов в клетках эпикарда (Wt1, Raldh2 и Tbx18) [11–13], что ведет к запуску ЭМП, их пролиферации и миграции с образованием эпикардальных прогениторных клеток (ЭПК) мезенхимального фенотипа [14, 15]. В субэпикардальной области ЭПК могут дифференцироваться в перicytes и гладкомышечные клетки сосудов [16–21], фибробласты [22], а по данным ряда исследований в эндотелиальные клетки и кардиомиоциты [23, 24]. Кроме того, пул ЭПК после повреждения может выступать в качестве источника биологически активных молекул, способствующих активации регенеративных процессов [1]. Эти свойства эпикарда делают его перспективной мишенью для воздействий, направленных на стимуляцию этих процессов. Результаты данного исследования показали, что локальная эпикардальная трансплантация сформированных *in vitro* тканеинженерных конструкций в виде клеточных пластов из МСК и наработанного ими внеклеточного матрикса после экспериментального инфаркта стимулирует эпикард, что проявляется в активации пролиферации эпикардальных клеток, повышении синтеза белков внеклеточного матрикса и утолщении субэпикардального слоя. Стимулом к такой активации является паракринное действие уникального коктейля ростовых факторов, цитокинов, антиоксидантов и микроРНК, секретируемых и высвобождаемых в виде экзосом/микровезикул клетками трансплантата. Наши предыдущие исследования, а также данные других научных групп указывают, что секретом МСК включает значительное количество биоактивных факторов [25–27] и внеклеточных везикул, в основном экзосом, продукция которых существенно увеличивается в условиях гипоксии [28–30]. Все эти факторы могут служить потенциальными регуляторами активации клеток эпикарда. На модели кардиальных эксплантов мы показали, что продукты секреции МСК, культивированных в состоянии как нормоксии, так и гипоксии, способны усиливать миграцию эпикардальных клеток, часть кото-

нificant differences in the number of explant culture cells developed after the MSC medium exposure and grown under normoxic and hypoxic conditions were revealed. The explant cells had «cobblestone» morphology and expressed the transcription factors (Wt1 and POD1) — characteristic of epicardial cell activation, which indicated their epicardial character. Noticeably, when cultivated in MSC medium, a part of peripherally located epicardial cells acquired a spindle-like shape, which may indirectly indicate their entry into the EMT and mesenchymal phenotype acquisition.

Immunofluorescent staining of myocardial sections showed that by Day 5 after MI intensive formation of capillaries and arterioles was observed (Fig. 2 c, d), both in the necrosis zone and in peri-infarction regions. In addition, there was a marked vascularization of the transplanted cellular graft containing vessels of different calibers. At the same time, we did not detect co-localization of the fluorescent dye PKH26 and the marker of endothelium Pecam, which indicates the formation of vessels was entirely based on endogenous endothelial cells. Moreover, we found an increase in the number of vessels under the transplanted graft compared to the control samples ( $456 \pm 69$  vs  $303 \pm 58$  vessels per vision field ( $P < 0.05$ ), respectively), and the vessels were also formed exclusively by the cells of the recipient animal (without fluorescent marker).

Acute coronary occlusion causes death of both numerous cardiomyocytes and epithelial-like mesothelial cells, which form the epicardium. Epicardial cells play a key role in the development of myocardium, coronary arteries, conduction system, and heart valves during the embryogenesis period [7–10], as well as they are cellular regulators of myocardial regeneration after MI. Normally, epicardium consists of a thin layer of mesothelium with quiescent cells. In myocardial damage, the reactivation of the embryonic gene expression program in epicardial cells (Wt1, Raldh2, and Tbx18) occurs [11–13], which leads to the launch of EMT, their proliferation and migration to form epicardial progenitor cells (EPC) of the mesenchymal phenotype [14, 15], in the subepicardial region, EPCs can differentiate into pericytes and vascular smooth muscle cells [16–21], fibroblasts [22], and according to several studies into endothelial cells and cardiomyocytes [23, 24]. In addition, after damage, the EPC pool can act as a source of biologically active molecules promoting the activation of regeneration [1]. These properties make the epicardium a promising target for the effects aimed at stimulating the above processes. The results of this study showed that local epicardial transplantation of tissue-engineered structures formed *in vitro* as cell sheets from MSCs and their extracellular matrix after an experimental infarction stimulates the epicardium, which results in activation of epicardial cell proliferation, increase in the production of extracellular matrix proteins, and thickening of

рых приобретает мезенхимоподобные характеристики, что указывает на их вступление в ЭМП, необходимый для репарации. Помимо паракринного воздействия механизмом активации эпикарда может служить контактное взаимодействие клеток трансплантата с эпикардальным клеточным слоем. Ранее, мы показали, что МСК в составе клеточного пласта несут на своей поверхности лиганды Jagged 1 и Delta-like 4 [31], которые при взаимодействии с рецепторами Notch на поверхности клеток эпикарда могут вызывать их активацию, сопровождающуюся формированием сосудистых клеток-предшественниц [32–34]. Оба механизма активации эпикарда клетками трансплантированного пласта могут способствовать образованию новых сосудов, что может объяснять увеличение васкуляризации зоны повреждения, особенно выраженное в субэпикардальной зоне, обнаруженное в данной работе. Помимо активации эпикарда важным механизмом стимуляции васкуляризации после инфаркта может служить комбинированное действие биоактивных компонентов секретора трансплантированных МСК и клеток активированного эпикарда. Все эти компоненты, обладающие ангиогенными и антиапоптотическими свойствами, могут способствовать более быстрому восстановлению кровоснабжения, подавлению апоптоза клеток в зоне повреждения и стимуляции пролиферации. Более того, секреция МСК молекул хемоаттрактантов, таких как MCP1, усиливает рекрутирование циркулирующих моноцитов в поврежденные участки сердца, где они могут способствовать ангиогенезу, секретируя ангиогенные факторы и дифференцируясь в эндотелиальные клетки [28, 29]. Реализации всех регенеративных свойств МСК оказывается возможной за счет поддержания жизнеспособности трансплантированных клеток в составе клеточного пласта, что показано в ряде работ [4, 5]. В более широком понимании клеточный пласт формирует некую подложку—«микроокружение» для клеток эпикарда, подобную той, что присутствует в субэпикардальной области неповрежденного сердца. Вероятно, это свойство обусловлено способностью МСК к построению микросреды (подобной микроокружению в периваскулярных или нишах костного мозга), которая сохраняется у этих клеток даже после этапа длительного культивирования *in vitro*.

### Заключение

Эпикардальная трансплантация пластов клеток на основе МСК после экспериментального ИМ активирует пул эпикардальных клеток и способствует развитию ранней васкуляризации зоны повреждения, что может быть

the subepicardial layer. Such activation is stimulated by the paracrine action of a unique cocktail of growth factors, cytokines, antioxidants and microRNAs secreted and released as exosomes/ microvesicles by transplant cells. Our previous studies, as well as data from other scientific groups, have shown that the MSC secrete a significant number of bioactive factors [25–27] and extracellular vesicles, mainly exosomes, which are increasingly produced in hypoxia [28–30]. All these factors can serve as potential regulators of epicardial cell activation. On the cardiac explant model, we showed that the secretion products of MSCs grown in both normoxia and hypoxia are capable of enhancing migration of epicardial cells, some of which acquire mesenchymal characteristics indicating their entry into epithelial-mesenchymal transition (EMT) required for repair. In addition to the paracrine effect, the mechanism of epicardial activation can include the contact interaction of the transplant cells with the epicardial cell layer. Earlier, we demonstrated that MSCs in the cell sheet carry Jagged 1 and Delta-like 4 ligands on their surface [31], which, when interacting with Notch receptors on the epicardial cell surface, may cause their activation accompanied by the formation of precursor vascular cells [32–34]. Both mechanisms of epicardial activation by the transplant sheet cells may promote the formation of new vessels, which may explain the increase in the vascularization of the damaged zone, especially evident in the subepicardial zone discovered in this study. In addition to the epicardial activation, the combined action of bioactive components of the secretome of transplanted MSCs and activated epicardial cells may serve as an important mechanism for stimulating vascularization after MI. All these components with angiogenic and antiapoptotic properties may contribute to faster restoration of blood supply, apoptosis suppression in the damaged area and stimulation of proliferation. Moreover, MSCs produce chemoattractant molecules, such as MCP1, enhancing the recruitment of circulating monocytes into the damaged myocardial regions, where they can participate in angiogenesis by secreting angiogenic factors and differentiating into endothelial cells [28, 29]. Several studies have shown that the regenerative properties of MSCs can be maintained by the viable transplanted cells in the cell sheet [4, 5]. In a broader sense, the cellular sheet forms a «microenvironment» for epicardial cells, similar to that found in the subepicardial region of the undamaged myocardium. This property is probably due to the ability of MSCs to create microenvironmental conditions (similar to those in perivascular or bone marrow niches), which persists even after long-term *in vitro* culturing.

### Conclusion

Epicardial cell sheet transplantation based on MSCs after experimental MI activates the epicardial cell pool and promotes early vascularization of the



важным фактором для осуществления эффективной репарации.

Таким образом, трансплантация ТИК на основе пластов МСК представляется рациональным подходом для эффективной доставки жизнеспособных клеток в миокард с целью активирующего воздействия на эпикардальную клеточную нишу и репаративный ангиогенез.

#### Благодарность.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №19-15-00384.

#### Литература

1. 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.
2. Wei K., Serpooshan V., Hurtado C., Diez-Cuñado M., Zhao M., Maruyama S., Zhu W., Fajardo G., Nosedá M., Nakamura K., Tian X., Liu Q., Wang A., Matsuura Y., Bushway P., Cai W., Savchenko A., Mahmoudi M., Schneider M.D., van den Hoff M.J., Butte M.J., Yang P.C., Walsh K., Zhou B., Bernstein D., Mercola M., Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature.* 2015; 525 (7570): 479–485. DOI: 10.1038/nature15372
3. Дергилев К. В., Цоколаева З. И., Рыжков И. А., Парфенова Е. В. Трансплантация пластов мезенхимальных прогениторных клеток сердца для васкуляризации миокарда после инфаркта. *Общая реаниматология.* 2018; 14 (6): 28–40 DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-28-40
4. Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Parfyonova E.V. Epicardial Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Based Cells Sheets is More Promising Method for Stimulation of Myocardial Regeneration, Than Conventional Cell Injections. *Kardiologiya.* 2019; 59 (5): 53–60. DOI: 10.18087/cardio.2019.5.2597. PMID: 31131768
5. Dergilev K., Tsokolayeva Z., Makarevich P., Beloglazova I., Zubkova E., Boldyreva M., Ratner E., Dykanov D., Menshikov M., Ovchinnikov A., Ageev F., Parfyonova Y.C. Kit Cardiac Progenitor Cell Based Cell Sheet Improves Vascularization and Attenuates Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in Rats. *Biomed Res Int.* 2018 Jun 25; 2018: 3536854. DOI: 10.1155/2018/3536854. eCollection 2018. PMID: 30046593
6. Traktuev D.O., Tsokolayeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Y.V. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol Ther.* 2007; 15 (11): 1939–46. Epub 2007 Jul 24. PMID: 17653104
7. Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Bergwerff M., Mentink M.M., Poelmann R.E. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 2000; 87 (11): 969–971. PMID: 11090540 DOI: 10.1161/01.res.87.11.969
8. 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. *Int J Dev Biol.* 2002; 46 (8): 1005–1013. PMID: 12533024
9. Poelmann R.E., Lie-Venema H., Gittenberger-de Groot A.C. The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J.* 2002; 29 (4): 255–261. PMID: 12484609
10. Schaefer K.S., Doughman Y.Q., Fisher S.A., Watanabe M. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn.* 2004; 229 (3): 489–499. PMID: 14991705
11. Zeng B., Ren X.F., Cao F., Zhou X.Y., Zhang J. Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. *J Biomed Sci.* 2011; 18: 67. DOI: 10.1186/1423-0127-18-67. PMID: 21871065
12. Limana F., Bertolami C., Mangoni A., Di Carlo A., Avitabile D., Mocini D., Iannelli P., De Mori R., Marchetti C., Pozzoli O., Gentili C., Zacheo A., Germani A., Capogrossi M.C. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit (+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48 (4): 609–618. Epub 2009 Dec 5. DOI: 10.1016/j.jmcc.2009.11.008. PMID: 19968998
13. Huang G.N., Thatcher J.E., McAnally J., Kong Y., Qi X., Tan W., DiMaio J.M., Amatruda J.F., Gerard R.D., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. *Science.* 2012; 338 (6114): 1599–1603. DOI: 10.1126/science.1229765. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23160954 PMCID: PMC3613149
14. von Gise A., Pu W.T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res.* 2012; 110 (12): 1628–1645. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259960. Review. PMID: 22679138
15. Smits A.M., Riley P.R. Epicardium-Derived Heart Repair. *J Dev Biol.* 2014; 2 (2): 84–100. PMID: 27536554 PMCID: PMC4984950 DOI: 10.3390/jdb2020084
16. Zhou B., Honor L.B., He H., Ma Q., Oh J.H., Butterfield C., Lin R.Z., Melero-Martin J.M., Dolmatova E., Duffy H.S., Gise A., Zhou P., Hu

damaged zone, which may be an important factor for effective reparation.

Thus, transplantation of TES based on MSC sheets appears to be a promising approach for the effective delivery of viable cells to myocardium in order to activate the epicardial cellular niche and angiogenesis.

#### Acknowledgement.

The work was financially supported by the RSCF grant No. 19-15-00384.

#### References

1. 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.
2. Wei K., Serpooshan V., Hurtado C., Diez-Cuñado M., Zhao M., Maruyama S., Zhu W., Fajardo G., Nosedá M., Nakamura K., Tian X., Liu Q., Wang A., Matsuura Y., Bushway P., Cai W., Savchenko A., Mahmoudi M., Schneider M.D., van den Hoff M.J., Butte M.J., Yang P.C., Walsh K., Zhou B., Bernstein D., Mercola M., Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature.* 2015; 525 (7570): 479–485. DOI: 10.1038/nature15372
3. Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Ryzhkov I.A., Parfyonova E.V. Transplantation of Cardiac Mesenchymal Progenitor Cell Sheets for Myocardial Vascularization after an Infarction (Experimental Study). *Obshchaya Reanimatologiya=General Reanimatology.* 2018; 14 (6): 28–40. [In Russ.] DOI: 10.15360/1813-9779-2018-6-28-40
4. Dergilev K.V., Tsokolayeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Parfyonova E.V. Epicardial Transplantation of Cardiac Progenitor Cells Based Cells Sheets is More Promising Method for Stimulation of Myocardial Regeneration, Than Conventional Cell Injections. *Kardiologiya.* 2019; 59 (5): 53–60. DOI: 10.18087/cardio.2019.5.2597. PMID: 31131768
5. Dergilev K., Tsokolayeva Z., Makarevich P., Beloglazova I., Zubkova E., Boldyreva M., Ratner E., Dykanov D., Menshikov M., Ovchinnikov A., Ageev F., Parfyonova Y.C. Kit Cardiac Progenitor Cell Based Cell Sheet Improves Vascularization and Attenuates Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in Rats. *Biomed Res Int.* 2018 Jun 25; 2018: 3536854. DOI: 10.1155/2018/3536854. eCollection 2018. PMID: 30046593
6. Traktuev D.O., Tsokolayeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Y.V. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol Ther.* 2007; 15 (11): 1939–1946. Epub 2007 Jul 24. PMID: 17653104
7. Gittenberger-de Groot A.C., Vrancken Peeters M.P., Bergwerff M., Mentink M.M., Poelmann R.E. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res.* 2000; 87 (11): 969–971. PMID: 11090540 DOI: 10.1161/01.res.87.11.969
8. 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. *Int J Dev Biol.* 2002; 46 (8): 1005–1013. PMID: 12533024
9. Poelmann R.E., Lie-Venema H., Gittenberger-de Groot A.C. The role of the epicardium and neural crest as extracardiac contributors to coronary vascular development. *Tex Heart Inst J.* 2002; 29 (4): 255–261. PMID: 12484609
10. Schaefer K.S., Doughman Y.Q., Fisher S.A., Watanabe M. Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn.* 2004; 229 (3): 489–499. PMID: 14991705
11. Zeng B., Ren X.F., Cao F., Zhou X.Y., Zhang J. Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. *J Biomed Sci.* 2011; 18: 67. DOI: 10.1186/1423-0127-18-67. PMID: 21871065
12. Limana F., Bertolami C., Mangoni A., Di Carlo A., Avitabile D., Mocini D., Iannelli P., De Mori R., Marchetti C., Pozzoli O., Gentili C., Zacheo A., Germani A., Capogrossi M.C. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit (+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48 (4): 609–618. Epub 2009 Dec 5. DOI: 10.1016/j.jmcc.2009.11.008. PMID: 19968998
13. Huang G.N., Thatcher J.E., McAnally J., Kong Y., Qi X., Tan W., DiMaio J.M., Amatruda J.F., Gerard R.D., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. *Science.* 2012; 338 (6114): 1599–1603. DOI: 10.1126/science.1229765. Epub 2012 Nov 15. PMID: 23160954 PMCID: PMC3613149
14. von Gise A., Pu W.T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res.* 2012; 110 (12): 1628–1645. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259960. Review. PMID: 22679138
15. Smits A.M., Riley P.R. Epicardium-Derived Heart Repair. *J Dev Biol.* 2014; 2 (2): 84–100. PMID: 27536554 PMCID: PMC4984950 DOI: 10.3390/jdb2020084
16. Zhou B., Honor L.B., He H., Ma Q., Oh J.H., Butterfield C., Lin R.Z., Melero-Martin J.M., Dolmatova E., Duffy H.S., Gise A., Zhou P., Hu

- Y.W., Wang G., Zhang B., Wang L., Hall J.L., Moses M.A., McGowan F.X., Pu W.T. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest.* 2011; 121 (5): 1894–1904. DOI: 10.1172/JCI45529. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21505261 PMCID: PMC3083761 DOI: 10.1172/JCI45529
17. van Wijk B., Gunst Q.D., Moorman A.F., van den Hoff M.J. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44692. DOI: 10.1371/journal.pone.0044692. Epub 2012 Sep 20. PMID: 23028582 PMCID: PMC3447884
  18. Smart N., Bollini S., Dubé K.N., Vieira J.M., Zhou B., Riegler J., Price A.N., Lythgoe M.F., Davidson S., Yellon D., Pu W.T., Riley P.R. Myocardial regeneration: expanding the repertoire of thymosin  $\beta 4$  in the ischemic heart. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1269: 92–101. PMID: 23045976 PMCID: PMC4084412 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06708.x
  19. Zangi L., Lui K.O., von Gise A., Ma Q., Ebina W., Ptaszek L.M., Später D., Xu H., Tabebordbar M., Gorbato R., Sena B., Nahrendorf M., Briscoe D.M., Li R.A., Wagers A.J., Rossi D.J., Pu W.T., Chien K.R. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol.* 2013; 31 (10): 898–907. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24013197 PMCID: PMC4058317 DOI: 10.1038/nbt.2682
  20. Smart N., Dubé K.N., Riley P.R. Identification of Thymosin  $\beta 4$  as an effector of Hand1-mediated vascular development. *Nat Commun.* 2010; 1: 46. PMID: 20975697 PMCID: PMC2963826 DOI: 10.1038/ncomms1041
  21. Zhou B.L., Pu W.T. Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *J Cell Mol Med.* 2011; 15 (12): 2781–2783. PMID: 21914126 PMCID: PMC3226901 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01450.x
  22. Russell J.L., Goetsch S.C., Gaiano N.R., Hill J.A., Olson E.N., Schneider J.W. A dynamic notch injury response activates epicardium and contributes to fibrosis repair. *Circ Res.* 2011; 108 (1): 51–59. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233262. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21106942
  23. Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (6): 692–703. Review. PMID: 17380310
  24. Limana F., Zacheo A., Mocini D., Mangoni A., Borsellino G., Diamantini A., De Mori R., Battistini L., Vigna E., Santini M., Loiaconi V., Pompilio G., Germani A., Capogrossi M.C. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007; 101 (12): 1255–1265. Epub 2007 Oct 18. PMID: 17947800
  25. Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Sukhareva O.Y., Shestakova M.V., Dergilev K.V., Parfyonova Y.V., Men'shikov M.Y. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem.* 2016; 117 (1): 180–196. DOI: 10.1002/jcb.25263. PMID: 26096299
  26. Hong S.J., Traktuev D.O., March K.L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15 (1): 86–91. DOI: 10.1097/MOT.0b013e328334f074 PMID: 19949335
  27. Saifi O., Ghandour B., Jaalouk D., Refaat M., Mahfouz R. Myocardial regeneration: role of epicardium and implicated genes. *Mol Biol Rep.* 2019. DOI: 10.1007/s11033-019-05075-0. PMID: 31549371
  28. Bargehr J., Ong L.P., Colzani M., Davaapil H., Hofsteen P., Bhandari S., Gambardella L., Le Novère N., Iyer D., Sampaziotis F., Weinberger F., Bertero A., Leonard A., Bernard W.G., Martinson A., Figg N., Regnier M., Bennett M.R., Murry C.E., Sinha S. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug; 37 (8): 895–906. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31375810 DOI: 10.1038/s41587-019-0197-9
  29. Wang S., Huang S., Gong L., Yuan Z., Wong J., Lee J., Si M.S. Human Neonatal Thymus Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 8503468. DOI: 10.1155/2018/8503468. eCollection 2018 PMID: 30305821
  30. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109 (10): 1292–1298. Epub 2004; DOI: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1 PMID: 14993122
  31. Shevchenko E.K., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Molokotina Y.D., Parfenova E.V., Men'shikov M.Y. Combination of Mesenchymal Stromal Cells and Cardiac Stem Cells in a Multilayer Cell Construct Promotes Activation of Notch Signaling and Initiation of Endothelial Differentiation. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 166 (4): 548–552. DOI: 10.1007/s10517-019-04390-7. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30783844
  32. Russell J.L., Goetsch S.C., Aguilar H.R., Frantz D.E., Schneider J.W. Targeting native adult heart progenitors with cardiogenic small molecules. *ACS Chem Biol.* 2012; 7 (6): 1067–1076. DOI: 10.1021/cb200525q. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22413910
  33. del Monte G., Casanova J.C., Guadix J.A., MacGrogan D., Burch J.B., Pérez-Pomares J.M., de la Pompa J.L. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 824–836. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229062. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21311046
  34. Grieskamp T., Rudat C., Lüdtke T.H., Norden J., Kispert A. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 813–823. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228809. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21252157
  - Y.W., Wang G., Zhang B., Wang L., Hall J.L., Moses M.A., McGowan F.X., Pu W.T. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest.* 2011; 121 (5): 1894–1904. DOI: 10.1172/JCI45529. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21505261 PMCID: PMC3083761 DOI: 10.1172/JCI45529
  17. van Wijk B., Gunst Q.D., Moorman A.F., van den Hoff M.J. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One.* 2012; 7 (9): e44692. DOI: 10.1371/journal.pone.0044692. Epub 2012 Sep 20. PMID: 23028582 PMCID: PMC3447884
  18. Smart N., Bollini S., Dubé K.N., Vieira J.M., Zhou B., Riegler J., Price A.N., Lythgoe M.F., Davidson S., Yellon D., Pu W.T., Riley P.R. Myocardial regeneration: expanding the repertoire of thymosin  $\beta 4$  in the ischemic heart. *Ann NY Acad Sci.* 2012; 1269: 92–101. PMID: 23045976 PMCID: PMC4084412 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06708.x
  19. Zangi L., Lui K.O., von Gise A., Ma Q., Ebina W., Ptaszek L.M., Später D., Xu H., Tabebordbar M., Gorbato R., Sena B., Nahrendorf M., Briscoe D.M., Li R.A., Wagers A.J., Rossi D.J., Pu W.T., Chien K.R. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol.* 2013; 31 (10): 898–907. Epub 2013 Sep 8. PMID: 24013197 PMCID: PMC4058317 DOI: 10.1038/nbt.2682
  20. Smart N., Dubé K.N., Riley P.R. Identification of Thymosin  $\beta 4$  as an effector of Hand1-mediated vascular development. *Nat Commun.* 2010; 1: 46. PMID: 20975697 PMCID: PMC2963826 DOI: 10.1038/ncomms1041
  21. Zhou B.L., Pu W.T. Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *J Cell Mol Med.* 2011; 15 (12): 2781–2783. PMID: 21914126 PMCID: PMC3226901 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01450.x
  22. Russell J.L., Goetsch S.C., Gaiano N.R., Hill J.A., Olson E.N., Schneider J.W. A dynamic notch injury response activates epicardium and contributes to fibrosis repair. *Circ Res.* 2011; 108 (1): 51–59. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233262. Epub 2010 Nov 24. PMID: 21106942
  23. Winter E.M., Gittenberger-de Groot A.C. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64 (6): 692–703. Review. PMID: 17380310
  24. Limana F., Zacheo A., Mocini D., Mangoni A., Borsellino G., Diamantini A., De Mori R., Battistini L., Vigna E., Santini M., Loiaconi V., Pompilio G., Germani A., Capogrossi M.C. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res.* 2007; 101 (12): 1255–1265. Epub 2007 Oct 18. PMID: 17947800
  25. Zubkova E.S., Beloglazova I.B., Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Sukhareva O.Y., Shestakova M.V., Dergilev K.V., Parfyonova Y.V., Men'shikov M.Y. Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *J Cell Biochem.* 2016; 117 (1): 180–196. DOI: 10.1002/jcb.25263. PMID: 26096299
  26. Hong S.J., Traktuev D.O., March K.L. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 15 (1): 86–91. DOI: 10.1097/MOT.0b013e328334f074 PMID: 19949335
  27. Saifi O., Ghandour B., Jaalouk D., Refaat M., Mahfouz R. Myocardial regeneration: role of epicardium and implicated genes. *Mol Biol Rep.* 2019. DOI: 10.1007/s11033-019-05075-0. PMID: 31549371
  28. Bargehr J., Ong L.P., Colzani M., Davaapil H., Hofsteen P., Bhandari S., Gambardella L., Le Novère N., Iyer D., Sampaziotis F., Weinberger F., Bertero A., Leonard A., Bernard W.G., Martinson A., Figg N., Regnier M., Bennett M.R., Murry C.E., Sinha S. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug; 37 (8): 895–906. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31375810 DOI: 10.1038/s41587-019-0197-9
  29. Wang S., Huang S., Gong L., Yuan Z., Wong J., Lee J., Si M.S. Human Neonatal Thymus Mesenchymal Stem Cells Promote Neovascularization and Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 8503468. DOI: 10.1155/2018/8503468. eCollection 2018 PMID: 30305821
  30. Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109 (10): 1292–1298. Epub 2004; DOI: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1 PMID: 14993122
  31. Shevchenko E.K., Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Molokotina Y.D., Parfenova E.V., Men'shikov M.Y. Combination of Mesenchymal Stromal Cells and Cardiac Stem Cells in a Multilayer Cell Construct Promotes Activation of Notch Signaling and Initiation of Endothelial Differentiation. *Bull Exp Biol Med.* 2019; 166 (4): 548–552. DOI: 10.1007/s10517-019-04390-7. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30783844
  32. Russell J.L., Goetsch S.C., Aguilar H.R., Frantz D.E., Schneider J.W. Targeting native adult heart progenitors with cardiogenic small molecules. *ACS Chem Biol.* 2012; 7 (6): 1067–1076. DOI: 10.1021/cb200525q. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22413910
  33. del Monte G., Casanova J.C., Guadix J.A., MacGrogan D., Burch J.B., Pérez-Pomares J.M., de la Pompa J.L. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 824–836. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.229062. Epub 2011 Feb 10. PMID: 21311046
  34. Grieskamp T., Rudat C., Lüdtke T.H., Norden J., Kispert A. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res.* 2011; 108 (7): 813–823. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228809. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21252157

Поступила 28.10.19

Received 28.10.19