

Участие рецептора активатора плазминогена урокиназного типа в формировании профиброзного микроокружения в эпикардиальной области

К. В. Дергилев^{1*}, З. И. Цоколаева^{1,2}, И. Б. Белоглазова¹, Ю. Д. Василец¹,
Д. О. Трактуйев³, Б. Н. Кульбицкий^{4,5}, Е. В. Парфенова^{1,6}

¹ Лаборатория ангиогенеза, Институт экспериментальной кардиологии, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Россия, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а

² НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ РР Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2,

³ Центр регенеративной медицины, Медицинское отделение, Медицинский колледж, Университет Флориды, США, Флорида 32610, Гейнсвилл, М421, 1600 SW Archer rd

⁴ Отдел патологии терминальных состояний кафедры судебной медицины, НИИ Морфологии человека, Россия, 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

⁵ Кафедра судебной медицины Российского университета дружбы народов, Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

⁶ Лаборатория постгеномных технологий в медицине, факультет фундаментальной медицины, Московский Государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119192, г. Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, стр. 1

Involvement of Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor in the Formation of a Profibrotic Microenvironment in the Epicardial Region

Konstantin V. Dergilev^{1*}, Zoya I. Tsokolayeva^{1,2}, Irina B. Beloglazova¹, Yuliya D. Vasilets¹,
Dmitry O. Traktuyev³, Boris N. Kulbitsky^{4,5}, Elena V. Parfenova^{1,6}

¹ Angiogenesis Laboratory, Experimental Cardiology Institute, National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of Russia, 15a Cherepkovskaya 3rd Str., 121552 Moscow, Russia

² 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

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

⁴ Pathology of Terminal States Section, Forensic Medicine Department, Research Institute of Human Morphology, 3 Tsyurupy Str., 117418 Moscow, Russia

⁵ Forensic Medicine Department, Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russia

⁶ Laboratory of Postgenomic Technologies in Medicine, Fundamental Medicine Faculty, Lomonosov Moscow State University, 27 Lomonosovsky Avenue, Bldg.1, 119192 Moscow, Russia

Для цитирования: К. В. Дергилев, З. И. Цоколаева, Ю. Д. Василец, Д. О. Трактуйев, Е. В. Парфенова. Участие рецептора активатора плазминогена урокиназного типа в формировании профиброзного микроокружения в эпикардиальной области. *Общая реаниматология*. 2021; 17 (6): 49–55. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2021-6-49-55> [На русск. и англ.]

Резюме

Изучение механизмов развития и прогрессирования фиброза является одним из ключевых направлений современной кардиологии. В рамках данной работы было сделано предположение, что в регуляции активности мезотелиальных клеток и развития эпикардиального фиброза определенная роль принадлежит урокиназному рецептору (uPAR), который при взаимодействии со специфическими лигандами и белками-посредниками, способен активировать внутриклеточный сигналинг, запускать каскад протеолитических реакций, включающих локальное образование плазмина и активацию матриксных металлопротеиназ, обеспечивая ремоделирование матрикса.

Цель работы: сравнительное исследование фиброгенной активности эпикарда в сердце uPAR-/- и животных дикого типа и изучение влияния факторов кардиальной микросреды на миграционную активность клеток эпикардиального мезотелия.

Материалы и методы. В работе использовали методы гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания, микроэррей анализ содержания провоспалительных цитокинов, метод оценки миграционных свойств клеток эпикарда.

Адрес для корреспонденции:

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

Correspondence to:

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

Результаты. Обнаружили, что в сравнении с животными дикого типа у uPAR^{-/-} животных происходит значительное утолщение зоны эпикарда (2,46±0,77 (uPAR^{-/-} мыши) и 1,02±0,17 (Wt мыши) относительных единиц, $p=0,033$), сопровождающееся аккумуляцией белков внеклеточного матрикса. Дефицит гена uPAR ведет к формированию провоспалительной микросреды в сердце (повышение уровня провоспалительных факторов: IL1, IL13, IL17, RANTES и MIP1), усилению миграционной активности клеток эпикардального мезотелия, накоплению TCF21+ предшественниц фибробластов/миофибробластов (29,8±13,7 (uPAR^{-/-} мыши) и 3,03±0,8 (Wt мыши) клеток в поле зрения, $p=0,02$) и развитию суб-эпикардального фиброза.

Заключение. Эти данные позволяют рассматривать uPAR в качестве перспективной мишени при разработке средств таргетного воздействия для предотвращения развития и прогрессирования кардиального фиброза.

Главный тезис

Дефицит рецептора активатора плазминогена урокиназного типа способствует формированию провоспалительного микроокружения и фиброгенному ремоделированию зоны эпикарда.

Ключевые слова: фиброз; эпикардальный мезотелий; урокиназный рецептор

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01368П и РФФИ 19-29-04164 (сборка сфероидов на основе клеток эпикарда).

Summary

The study of the mechanisms of development and progression of fibrosis is one of the key directions of modern cardiology. Our work suggests that the urokinase receptor (uPAR) is involved in the regulation of mesothelial cell activity and epicardial fibrosis development, which, when interacting with specific ligands and intermediate proteins, can activate intracellular signaling, trigger the cascade of proteolytic reactions, including local plasmin formation and activation of matrix metalloproteinases, providing matrix remodeling.

Objective: to perform a comparative study of fibrogenic activity of the epicardium in the hearts of uPAR^{-/-} and wild-type animals and evaluate the effect of cardiac microenvironment factors on the migration activity of epicardial mesothelial cells.

Material and methods. We used histological and immunofluorescent staining, microarray analysis of proinflammatory cytokine levels, and a method for assessing the migratory properties of epicardial cells.

Results. Results. We found that compared to wild-type animals, uPAR^{-/-} animals show significant thickening of the epicardial area (2.46±0.77 (uPAR^{-/-} mice) and 1.02±0.17 (Wt mice) relative units, $P=0.033$) accompanied by accumulation of extracellular matrix proteins. Deficiency of uPAR gene leads to formation of proinflammatory microenvironment in the heart (increased levels of proinflammatory factors such as IL-1, IL-13, IL-17, RANTES and MIP1), increased migratory activity of epicardial mesothelial cells, accumulation of TCF21+ fibroblast/myofibroblast precursors (29.8±13.7 (uPAR^{-/-} mouse) and 3.03±0.8 (Wt mouse) cells per visual field, $P=0.02$), as well as development of subepicardial fibrosis.

Conclusion. These findings suggest that uPAR is a promising candidate for the developing targeted agents to prevent the development and progression of cardiac fibrosis.

Highlight

Deficiency of urokinase-type plasminogen activator receptor contributes to the formation of proinflammatory microenvironment and fibrogenic remodeling of epicardial area.

Keywords: fibrosis; epicardial mesothelium; urokinase receptor

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation grant 17-15-01368P and the Russian Foundation for Basic Research 19-29-04164 (epicardial cell-based spheroids assembly).

DOI:10.15360/1813-9779-2021-6-49-55

Введение

Белки внеклеточного матрикса (ВКМ) являются важным регулятором структурной организации взрослого сердца, координирующим эффективное электромеханическое сопряжение клеток миокарда, а также формирующим уникальное микроокружение для

поддержания фундаментальных характеристик клеток и выполнения их репаративных функций [1]. В здоровом сердце сохраняется баланс компонентов ВКМ посредством их ферментативной деградации и синтеза *de novo*, что обеспечивает поддержание нормального гомеостаза микросреды. Однако при развитии

патологических состояний этот баланс нарушается, что приводит к чрезмерному отложению матрикса, известному как сердечный фиброз, который оказывает существенное влияние на сердечную функцию, увеличивая жесткость миокарда и нарушая электрическую проводимость. Подсчитано, что фиброз различных органов прямо или косвенно является причиной почти 45% смертей в развитых странах, что имеет чрезвычайно важное социальное значение и несет колоссальную экономическую нагрузку на общество [2, 3]. На сегодняшний день отсутствуют эффективные способы обратить вспять процесс патологической перестройки клеточного микроокружения и повлиять на активность фибропластических процессов в сердце, что неизбежно приводит к развитию тяжелой сердечной недостаточности и смерти. Поэтому поиск новых биологических мишеней и изучение механизмов развития кардиального фиброза не теряет своей актуальности. В этом отношении интерес обращен к эпикарду — наружному мембраноподобному слою сердца, сформированного гетерогенной популяцией клеток, и эпикардального мезотелия и белками внеклеточного матрикса. Исследования линий трансгенных мышей с использованием Cre-lox гомологичной рекомбинации, направленной на гены опухоли Вильмса 1 (Wt1) и Tcf21, выявили в эпикарде популяцию клеток-предшественников, которые подвергаются эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) во время эмбрионального развития и дифференцируются в резидентную линию фибробластов [4–8]. Во взрослом сердце при возникновении ишемии или перегрузки давлением происходит ремоделирование эпикардального микроокружения, что ведет к реэкспрессии фетальных эпикардальных генов и фибробластоподобной трансформации клеток [9–11].

В рамках данного исследования было сделано предположение, что в качестве регулятора процессов ремоделирования эпикардального микроокружения может выступать урокиназный рецептор (uPAR) [12, 13]. Он является неотъемлемой частью урокиназной системы, которая также включает урокиназу (uPA) и два ингибитора (PAI-1 и PAI-2). uPAR закреплен в клеточной мембране через ГФИ-якорь, что позволяет ему быть подвижным в мембранном биле и локально концентрировать протеолитическую активность урокиназы в направлении движения клетки. Запускаемый урокиназой каскад протеолитических реакций, включающих локальное образование плазмина и активацию матриксных металлопротеиназ, обеспечивает ремоделирование матрикса. Однако, помимо активации внеклеточного протеолиза

большинство клеточных ответов, модулированных урокиназой системой, обеспечивается с помощью трансмембранной сигнализации, которая опосредуется взаимодействием компонентов этой системы с белками-посредниками, например — интегринами.

Цель работы — сравнительное исследование фиброгенной активности эпикарда в сердце uPAR-/- и животных дикого типа и изучение влияния факторов кардиальной микросреды на миграционную активность клеток эпикардального мезотелия.

Материал и методы

Животные. В работе использовали самцов мышей линии C57BL/129 (дикого типа; $n=20$) и нокаутных по гену uPAR C57BL/129 (uPAR-/- мыши; $n=20$), предоставленные на безвозмездной основе факультетом фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУ НМИЦ кардиологии.

Детекция коллагеновых волокон в зоне эпикарда. Визуализацию коллагенов в зоне эпикарда проводили путем окрашивания криосрезов пикросирусом красным, в соответствии с ранее описанным методом [14].

Детекция TCF21+ клеток-предшественников фибробластов в зоне эпикарда. Для проведения анализа TCF21 клеток использовали метод иммуногистохимического окрашивания с применением коммерческого набора ABC Elite Kit («Vector Lab», США). Криосрезы размораживали при комнатной температуре (30 минут), промывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (5 минут) и фиксировали в 3,7% растворе параформальдегида (10 минут). После фиксации срезы промывали ФСБ (3 раза по 5 минут), проводили пермеабиллизацию 0,1% раствором Тритона X100 (5 минут) и забивку эндогенной пероксидазы с помощью 3% раствора H_2O_2 с последующей отмывкой в ФСБ. Далее, срезы блокировали раствором, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 10% сыворотки донора вторых антител в ФСБ (30 мин). После этого криосрезы окрашивали антителами к маркеру TCF 21 («Vilegend», США) в течение 1 часа. Затем, стекла промывали в ФСБ (3 раза по 5 минут) и наносили на срезы вторичные биотинилированные антитела на 30 минут. Далее, срезы отмывали в ФСБ и обрабатывали ABC китом в течение 30 минут. После этого стекла отмывали в ФСБ и детектировали окраску с помощью субстрата, входящего в состав набора «DAB substrate kit». После окрашивания слайды промывали дистиллированной водой, обезвоживали и монтировали, используя среду на основе ксилола.

Получение культуры клеток эпикардального мезотелия. Выделение клеток проводили в соответствии с протоколом, описанным ранее [15].

Сборка сфероидов на основе клеток эпикардального мезотелия. Для сборки эпикардальных сфероидов использовали V-образные чашки с низкодгезионным покрытием GravityTRAP™ ULA Plate. Для получения сфероидов суспензию клеток

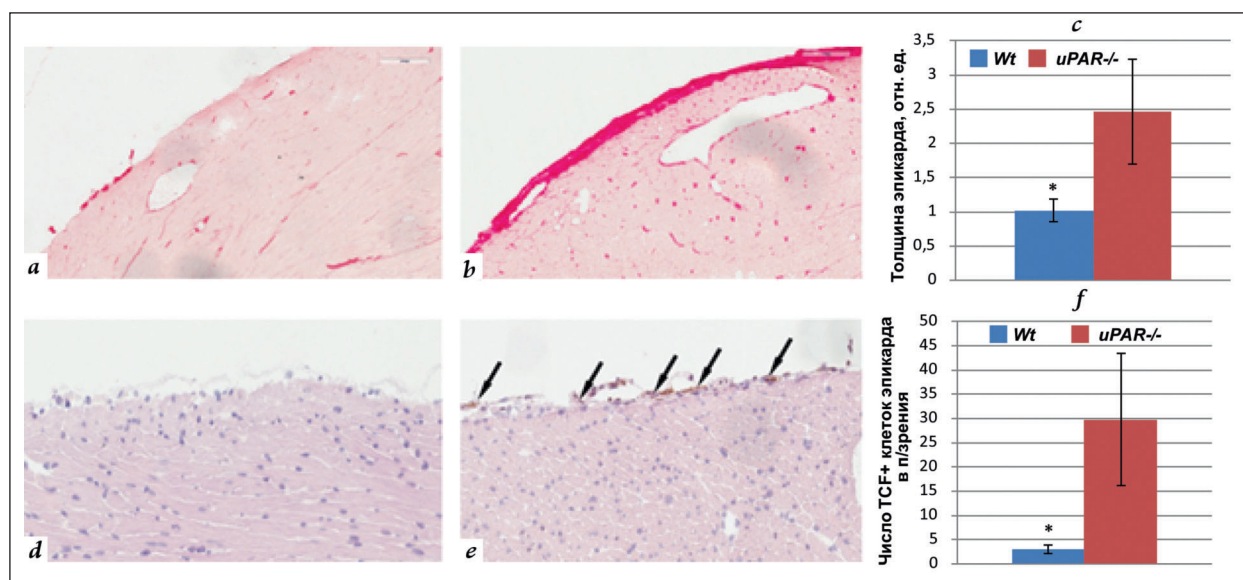


Рис. 1. Дефицит урокиназного рецептора ассоциирован с утолщением эпикарда и увеличением числа TCF+ клеток-предшественниц фибробластов.

Примечание. Репрезентативные окрашивания срезов сердца мышей дикого типа (A) и uPAR^{-/-} (b) пикросирусом красным. c — количественная оценка толщины зоны эпикарда у мышей дикого типа и uPAR^{-/-}. Репрезентативные окрашивания срезов сердца мышей дикого типа (d) и uPAR^{-/-} (e) антителами к маркеру клеток-предшественниц фибробластов — TCF21. f — количественная оценка содержания TCF21+ клеток-предшественниц фибробластов в сердце мышей дикого типа и uPAR^{-/-}. Данные представили в виде среднего значения ± стандартное отклонение (M ± SD). * — p < 0,05.

(5000 клеток в 70 мкл среды культивирования) высаживали в лунки планшета, осаждали с помощью центрифугирования (200 g, 2 минуты) и культивировали 72 часа (в среде IMDM с добавлением 1% фетальной сыворотки телят) в стандартных условиях инкубатора (37°C, 5% CO₂).

Оценка миграционных свойств клеток эпикардиального сфероидов под действием кондиционированной среды Wt и uPAR^{-/-} кардиальных эксплантов. Сформированные сфероиды помещали в культуральные чашки 48-луночного планшета с добавлением кондиционированной среды Wt и uPAR^{-/-} кардиальных эксплантов (½ кондиционированной среды и ½ среды IMDM без сыворотки и других добавок). Культивирование сфероидов проводили в течение 3х суток с документированием изображений каждые 24 часа. Оценка площади миграции и длины миграционного пути выполняли с помощью программы Image J («НИН», США)

Микроэррейный анализ секреции провоспалительных факторов клетками Wt и uPAR^{-/-} кардиальных эксплантов. Сердца извлекали из грудной полости, иссекали крупные сосуды и тщательно промывали в растворе фосфато-солевого буфера. Далее, сердца помещали в стерильные чашки Петри и измельчали ножницами до получения размеров кусочков 1–2 мм. Полученные измельченные образцы сердец взвешивали и выравнивали по массе. Далее, измельченные образцы (экспланты) высаживали в культуральные чашки (без покрытия) в среду IMDM («Gibco», США) без добавок и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 48 часов экспланты удаляли, а кондиционированную среду подвергали 2 этапам центрифугирования (1000 g, 20 минут). Полученный супернатант аликвотили и хранили при температуре -70°C до проведения исследований провоспалительных цитокинов и экспериментов *in vitro*.

Исследование уровня воспалительных цитокинов в кондиционированных средах кардиальных эксплантов uPAR^{-/-} мышей и животных дикого типа выполняли с помощью Mouse Inflammation Antibody Array («Abcam», США) строго в соответствии с рекомендациями производителя набора.

Статистический анализ. Оценка «нормальности» распределения проводили с помощью критерия Колмагорова–Смирнова. Статистическую значимость различий между выборками оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.). Данные представили в виде среднего значения ± стандартное отклонение (M ± SD).

Результаты

В сердце животных возрастом 1 год, нокаутных по гену uPAR (uPAR^{-/-} мыши) наблюдали аккумуляцию коллагеновых волокон, которая сочеталась с 2,4-кратным утолщением эпикардиальной области (2,46 ± 0,77 (uPAR^{-/-} мыши) и 1,02 ± 0,17 (Wt мыши) относительных единиц, p = 0,033), чего не отмечали у животных дикого типа (рис. 1, a–c). Учитывая выявленные изменения, провели оценку содержания клеток-предшественниц фибробластов в этой зоне сердечной стенки. Для идентификации предшественниц фибробластов использовали транскрипционный фактор Tcf21. Этот маркер представлен в популяции клеток эпикардиального мезотелия и проэпикарда и участвует в регуляции дифференцировки в направлении фибробластоподобных

производных [7, 8]. Обнаружили, что число TCF21+ клеток было в 9 раз выше (рис. 1, с–е) в эпикарде/субэпикарде uPAR-/- мышей в сравнении с мышами дикого типа ($29,8 \pm 13,7$ и $3,03 \pm 0,8$ клеток в поле зрения, соответственно; $p=0,02$).

Для установления факторов, способных инициировать ремоделирование зоны эпикарда провели анализ уровня провоспалительных цитокинов в образцах кондиционированных сред кардиальных эксплантов (рис. 2, а), повышенный уровень которых ассоциирован с развитием фиброза. В среде uPAR-/- мышей наблюдали повышенное содержание провоспалительных факторов (IL1, IL13, IL17, RANTES и MIP1), в сравнении со средами контрольных эксплантов (из сердец мышей дикого типа).

Поскольку утолщение эпикардального слоя сердца сопряжено с потерей межклеточных контактов и перераспределением мезотелиальных клеток, мы провели анализ влияния факторов провоспалительного микроокружения на миграционные свойства клеток. Для исследования клеточной подвижности использовали 3D модель эпикардального микроокружения построенную по типу сфероида, обеспечивающую пространственное взаимодействие клеток и формирование кадгериновых межклеточных контактов. Площадь распределения клеток (на 3й день: 1069900 ± 226137 (среда Wt эксплантов) и 3329643 ± 312000 (среда uPAR-/- эксплантов; $p=0,04$) относительных единиц) и максимальная длина миграционного пути (на 3й день: 526 ± 86 (среда Wt эксплантов) и 987 ± 57 (среда uPAR-/- эксплантов) относительных единиц; $p=0,01$) эпикардальных клеток были значимо выше при использовании кондиционированных сред от uPAR-/- кардиальных эксплантов, в сравнении с контрольными средами (рис. 2, b–e).

Обсуждение

Проведенные исследования показали, что отсутствие гена uPAR сопряжено с формированием провоспалительного микроокружения в сердце, накоплением TCF21+ предшественниц миофибробластов и развитием субэпикардального фиброза. Это позволяет выдвинуть гипотезу о том, что uPAR необходим для поддержания целостности эпикардального слоя сердца и регуляции профиброгенной активности клеток мезотелия. uPAR широко представлен в эпителиоподобных клетках разных типов, вовлечен в процессы ремоделирования тканей и участвует в регуляции важнейших биологических процессах, включая ЭМП, ангиогенез, фибринолиз, воспаление, опухолевая инвазия и метастазирование [12, 13, 16].

В условиях отсутствия uPAR функционирование урокиназной системы нарушается, что,

вероятно, является одной из причин перестройки эпикардального/субэпикардального микроокружения. Действительно, в сердце uPAR-/- мышей наблюдали повышенный уровень провоспалительных факторов, которые могут выступать в качестве самостоятельных регуляторов клеточных функций и служить патогенетической основой развития фиброза. В исследовании профессора Джена (Genua) [17] показано, что дефицит uPAR вызывает поляризацию макрофагов в M1 направлении и способствует усилению секреции провоспалительных цитокинов, что может служить основой формирования провоспалительной микросреды.

В неповрежденном сердце мезотелий имеет полигональную эпителиоподобную морфологию, однако под влиянием воспалительных факторов он может подвергаться трансдифференцировке в мезенхимальном направлении и приобретать промиграционные, проинвазивные и фибробластоподобные характеристики. В основе перехода от мезотелиального к мезенхимальному (фибробластоподобному) фенотипу uPAR-/- животных может быть комплексное воздействие воспалительных факторов и измененная активность Ras-ERK1,2 MAPK, Rac1 и PI3K-AKT внутриклеточных сигнальных путей (из-за нарушенного взаимного влияния uPAR-интегринов или других посредников) [18, 19], что ведет к нарушению межклеточных контактов, потере поляриности клеток и реорганизации цитоскелета. Вероятно, запуск этой необратимой реакции является основой для формирования фибробластов/миофибробластов, гиперкопродуцирующих белки внеклеточного матрикса, формирование которых находится под контролем uPAR.

Отсутствие рецептора ведет к ингибированию uPAR-зависимой регуляции функций интегринов, усилению клеточной адгезии, стимулирует переход фибробластов в миофибробласты, за счет формирования адгезионных контактов и усиленной сборки/стабилизации волокон гладкомышечного альфа-актина [20–22]. Дополнительным неблагоприятным фактором-индуктором перестройки эпикардального микроокружения может быть накопление в сердце свободной (не связанной с uPAR) урокиназы, которая путем взаимодействия с нуклеолином способна транспортироваться в ядро и активировать экспрессию ЭМТ-ассоциированных и профибротических генов [23, 24]. Не исключается также и другой механизм, связанный с взаимодействием урокиназы с альтернативными рецепторами, например, с N-холинорецепторами, регулирующими функции фибробластов [25] и развитие/прогрессирование фиброза.

Результаты, полученные при исследовании uPAR-/- животных, имеющих признаки

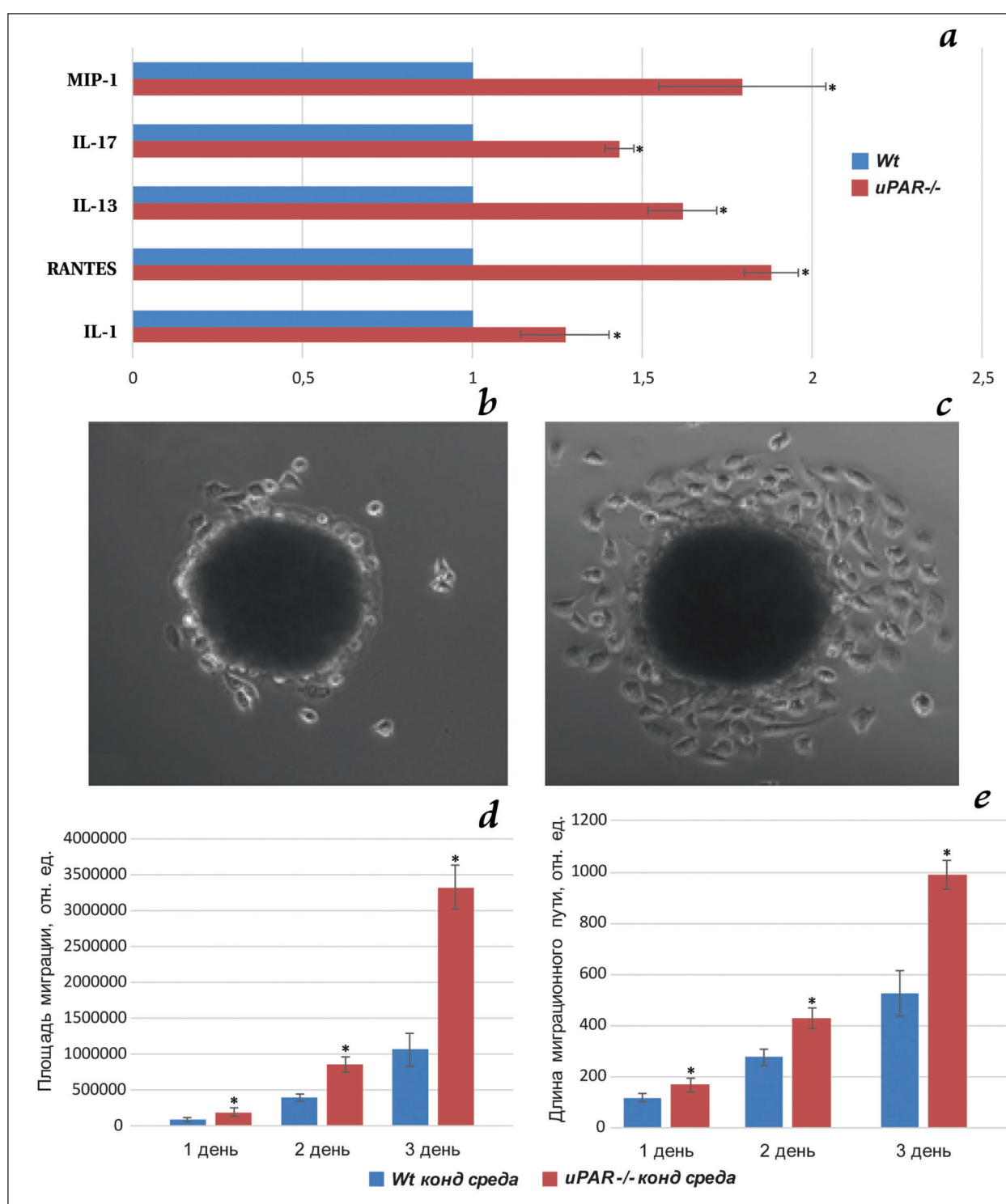


Рис. 2. Кондиционированная среда uPAR-/- кардиальных эксплантов характеризуется высоким содержанием провоспалительных факторов и оказывает стимулирующее воздействие на миграционные свойства клеток эпикарда.

Примечание. *a* — количественная оценка содержания провоспалительных факторов в среде кардиальных эксплантов мышей дикого типа и uPAR-/-, *b, c* — репрезентативные изображения миграции клеток эпикарда из сфероидов под действием кондиционированной среды кардиальных эксплантов мышей дикого типа (*b*) и uPAR-/- (*c*). *d, e* — морфометрическая оценка площади распределения клеток и максимальной длины миграционного пути при культивировании эпикардиальных сфероидов в кондиционированной среде кардиальных эксплантов мышей дикого типа и uPAR-/- . Данные представили в виде среднего значения ± стандартное отклонение (M±SD). * — $p < 0,05$.

формирования воспалительного микроокружения в сочетании с фиброзом сердца обладают общими чертами с клинической картиной, наблюдаемой у пациентов с системной

склеродермией — состоянии, также характеризующемся потерей функции uPAR вследствие его протеолитического расщепления MMP12 [26]. У подобных пациентов наблюдается

ся повышенный уровень IL1, IL17, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 и IL-8/CXCL8, что сопровождается повышением активности ЭМП, образованием избыточного количества фибробластов и фиброзной трансформацией различных тканей, включая сердце [27, 28].

Заключение

Таким образом, uPAR может рассматриваться как многоуровневый регулятор эпикардального микроокружения. Дефицит этого

гена ведет к формированию провоспалительной микросреды в сердце, усилению миграционной активности клеток эпикардального мезотелия, накоплению TCF21+ предшественниц фибробластов/миофибробластов и развитию субэпикардального фиброза. Эти данные позволяют рассматривать uPAR в качестве перспективной мишени для разработки средств таргетного воздействия в целях предотвращения развития и прогрессирования кардиального фиброза.

Литература

1. Derrick C.J., Noël E.S. The ECM as a driver of heart development and repair. *Development*. 2021; 148 (5): DOI: 10.1242/dev.191320. PMID: 33674261.
2. Nair N. Epidemiology and pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction. Review. *Cardiovasc Med*. 2020; 21 (4): 531–540. DOI: 10.31083/j.rcm.2020.04.154.
3. Mocumbi A.O., Stothard J.R., Correia-de-Sá P., Yacoub M. Endomyocardial Fibrosis: an Update After 70 Years. *Curr Cardiol Rep*. 2019; 21 (11): 148. DOI: 10.1007/s11886-019-1244-3. PMID: 317583524.
4. Zhou B., A. von Gise., Ma Q., Hu Y.W., Pu W.T. Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosus of the mammalian heart. *Dev. Biol.* 338 (2010) 251–261. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.12.007. PMID: 20025864. PMID: PMC2815244
5. Wessels A, van den Hoff M.J., Adamo R.F., Phelps A.L., Lockhart M.M., Sauls K., Briggs L.E., Norris R.A., van Wijk B., Perez-Pomares J.M., Dettman R.W., Burch J.B. Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Dev. Biol.* 2012; 366: 111–124. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.04.020. PMID: 22546693. PMID: PMC3358438
6. von Gise A., Zhou B., Honor L.B., Ma Q., Petryk A., Pu W.T. Wt1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through beta-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev. Biol.* 2011; 356: 421–431. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.05.668. PMID: 21663736. PMID: PMC3147112
7. Braitsch C.M., Combs M.D., Quaggin, S.E., Yutzey K.E. Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Dev. Biol.* 2012; 368: 345–357. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.06.002. PMID: 22687751. PMID: PMC3414197
8. Acharya, A., Baek, S.T., Huang, G., Eskiocak, B., Goetsch, S., Sung, C.Y., Banfi, S., Sauer M.F., Olsen G.S., Duffield J.S. The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development*. 2012; 139: 2139–2149. DOI: 10.1242/dev.079970. PMID: 22573622. PMID: PMC3357908
9. Moore-Morris T., Cattaneo P., Guimaraes-Camboa N., Bogomolova J., Cedenilla M., Banerjee I., Ricote M., Kisseleva T., Zhang L., Gu Y., Dalton N.D., Peterson K.L., Chen J., Pucaat M., Evans S.M. Infarct fibroblasts do not derive from bone marrow lineages. *Circ. Res.* 2012; 122 (4): 583–590. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311490. PMID: 29269349. PMID: PMC5815911
10. Moore-Morris T., Guimaraes-Camboa N., Banerjee I., Zambon A.C., Kisseleva T., Velayoudon A., Stallcup W.B., Gu Y., Dalton N.D., Cedenilla M., Gomez-Amaro R., Zhou B., Brenner D.A., Peterson K.L., Chen J., Evans S.M. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 2014; 124 (7): 2921–2934. DOI: 10.1172/JCI7478.3. PMID: 24937432. PMID: PMC4071409
11. Braitsch C.M., Kanisak O., van Berlo J.H., Molkentin J.D., Yutzey K.E. Differential expression of embryonic epicardial progenitor markers and localization of cardiac fibrosis in adult ischemic injury and hypertensive heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 65: 108–119. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.10.005. PMID: 24140724. PMID: PMC3848425
12. Santì A.Li., Napolitano F., Montuori N., Ragno P. The Urokinase Receptor: A Multifunctional Receptor in Cancer Cell Biology. Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (8): 4111. DOI: 10.3390/ijms22084111. PMID: 33923400. PMID: PMC8073738
13. Dergilev K.V., Stepanova V.V., Beloglazova I.B., Tsokolayev Z.I., Parfenova E.V. Multifaceted Roles of the Urokinase System in the Regulation of Stem Cell Niches. *Acta Naturae*. 2018; 10 (4): 19–32. PMID: 30713759. PMID: PMC6351041
14. Junqueira L.C., Bignolas G., Brentani R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11: 447–455. DOI: 10.1007/bf01002772
15. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Ratner E.I., Parfenova E.V. Transforming Growth Factor Beta (TGF- β 1) Induces Pro-Reparative Phenotypic Changes in Epicardial Cells in Mice. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 170 (4): 565–570. DOI: 10.1007/s10517-021-05107-5.
16. Baart V.M., Houvast R.D., de Geus-Oei L.E., Quax P.H.A., Kuppen P.J.K., Vahrmeijer A.L., Sier C.F.M. Molecular imaging of the urokinase plasminogen activator receptor: opportunities beyond cancer. *EJNMMI Res.* 2020; 10 (1): 87. DOI: 10.1186/s13550-020-00673-7. PMID: 32725278. PMID: PMC7387399
17. Genua M., D'Alessio S., Cibella J., Gandelli A., Sala E., Corrales C., Spinelli A., Arena V., Malesci A., Rutella S., Ploplis V.A., Vetrano S., Danese S. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) controls macrophage phagocytosis in intestinal inflammation. *Gut*. 2015; 64 (4): 589–600. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-305933. PMID: 24848264
18. Jo M., Takimoto S., Montel V., Gonias S.L. The urokinase receptor promotes cancer metastasis independently of urokinase-type plasminogen activator in mice. *Am J Pathol.* 2009; 175 (1): 190–200. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081053. PMID: 19497996. PMID: PMC2708805
19. Jo M., Lester R.D., Montel V., Eastman B., Takimoto S., Gonias S.L. Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling. *J Biol Chem.* 2009; 284 (34): 22825–22833 DOI: 10.1074/jbc.M109.023960. PMID: 19546228. PMID: PMC2755690
20. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Prunotto M., Desmoulière A., Varga J., De Wever O., Mareel M., Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012; 180 (4): 1340–1355. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004. PMID: 22387320. PMID: PMC3640252
21. Castella L.F., Buscemi L., Godbout C., Meister J.J., Hinz B. A new lock-step mechanism of matrix remodeling based on subcellular contractile events. *J Cell Sci.* 2010; 123 (Pt 10): 1751–1760. DOI: 10.1242/jcs.066795. PMID: 20427321
22. Wang L., Ly C.M., Ko C.Y., Meyers E.E., Lawrence D.A., Bernstein A.M. uPA binding to PAI-1 induces corneal myofibroblast differentiation on vitronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53 (8): 4765–4775. DOI: 10.1167/iovs.12-10042. PMID: 22700714. PMID: PMC3949353
23. Stepanova V., Lebedeva T., Kuo A., Yarovoi S., Tkachuk S., Zaitsev S., Bdeir K., Dumler I., Marks M.S., Parfyonova Y., Tkachuk V.A., Higazi A.A., Cines D.B. Nuclear translocation of urokinase-type plasminogen activator. *Blood*. 2008; 112 (1): 100–110. DOI: 10.1182/blood-2007-07-104455. PMID: 18337556. PMID: PMC2435680
24. Semina E.V., Rubina K.A., Shmakova A.A., Rysenkova K.D., Klimovich P.S., Aleksandrushkina N. A., Sysoeva V. Y., Karagayur M.N., Tkachuk V.A. Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma. *J Cell Physiol.* 2020; 235 (9): 6268–6286. DOI: 10.1002/jcp.29555. PMID: 31990070. PMID: PMC7318179
25. Zhang G., Kernan K.A., Thomas A., Collins S., Song Y., Li L., Zhu W., Leboeuf R.C., Eddy A.A. A novel signaling pathway: fibroblast nicotinic receptor alpha1 binds urokinase and promotes renal fibrosis. *J Biol Chem.* 2009; 284 (42): 29050–29064. DOI: 10.1074/jbc.M109.010249. PMID: 19690163. PMID: PMC2781451
26. Manetti M., Rosa I., Fazi M., Guiducci S., Carmeliet P., Ibba-Manneschi L., Mautucci-Cerinic M. Systemic sclerosis-like histopathological features in the myocardium of uPAR-deficient mice. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75 (2): 474–478. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-207803. PMID: 26269399
27. Mohameden M., Vashisht P., Sharman T. Scleroderma And Primary Myocardial Disease. 2021. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan. PMID: 32491618
28. Nikitorowicz-Buniak J., Denton C.P., Abraham D., Stratton R. Partially Eoked Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Is Associated with Increased TGF β Signaling within Lesional Scleroderma Skin. *PLoS One*. 2015; 10 (7): e0134092. DOI: 10.1371/journal.pone.0134092. PMID: 26217927

Поступила 09.02.21