

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Докшин Павел Михайлович

Notch-зависимые механизмы функциональной регуляции мезенхимных клеток
сердца при остром инфаркте и пороках развития

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Малашичева Анна Борисовна

Санкт-Петербург – 2024

<i>Введение</i>	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Развитие сердца	17
1.2 Сигнальный путь Notch	18
1.3 Сигнальный путь Notch в развитии сердца	25
1.4 Пороки развития сердца	29
1.5 Гомеостаз и регенерация сердца.....	30
1.6 Мезенхимные клетки сердца	31
1.6.1 Открытие стволовых клеток сердца	31
1.6.2 Популяция клеток c-Kit ⁺	34
1.6.3 Колониеобразующие единицы фибробластов сердца	35
1.6.4 Популяция клеток Isl-1 ⁺	36
1.6.5 Популяция клеток Sca-1 ⁺ и клеток, полученных из кардиосфер	37
1.7 Роль сигнального пути Notch в регуляции свойств мезенхимных клеток сердца	38
1.8 Взаимодействие BMP2 и сигнального пути Notch в контексте эндотелиально-мезенхимного перехода	40
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1 Лабораторные животные	41
2.2 Индукция инфаркта миокарда	41
2.3 Пациенты.....	42
2.4 Клеточные культуры	42
2.4.1 Мезенхимные клетки сердца крыс.....	42
2.4.2 Мезенхимные клетки сердца человека	44
2.4.3 Дифференцировка мезенхимных клеток сердца в кардиогенном, адипогенном и остеогенном направлениях.....	45
2.4.4 Анализ пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца.....	46

2.4.5	Анализ скорости миграции мезенхимных клеток сердца крыс.....	46
2.4.6	Индукция гипоксии <i>in vitro</i>	46
2.4.7	Иммуноцитохимическая окраска мезенхимных клеток сердца	47
2.4.8	Эндотелиальные клетки пупочной вены человека.....	48
2.4.9	Сокультивирование культур эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека	48
2.5	Плазмиды	48
2.5.1	Производство лентивирусных частиц.....	48
2.5.2	Трансдукция культур эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека лентивирусными векторами BMP2 и NICD.....	49
2.6	Анализ генной экспрессии.....	49
2.7	Подготовка библиотек для секвенирования РНК.....	51
2.8	Дифференциальный анализ экспрессии генов.....	52
2.9	Анализ путей <i>Ingenuity</i>	52
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1	Механизмы активации регенеративного потенциала мезенхимных клеток сердца	53
3.1.1	Профиль экспрессии генов значительно изменяется в тканях миокарда через 24 часа после инфаркта.....	53
3.1.2	В постинфарктном миокарде усиливаются процессы раннего ремоделирования, в которые вовлечены компоненты сигнальных путей NOTCH и BMP	57
3.1.3	Активация компонентов сигнального пути Notch и <i>Vmp2/Runx2</i> в постинфарктных тканях миокарда	68
3.1.4	Постинфарктные мезенхимные клетки сердца крыс обладают свойствами мезенхимных стволовых клеток и имеют выраженный потенциал к дифференцировке.....	69
3.1.5	Постинфарктные мезенхимные клетки сердца крыс обладали способностью к активной пролиферации и миграции.....	74
3.1.6.	Профиль экспрессии генов ИМ-МКСк был изменен	78

3.1.7 Анализ канонических сигнальных путей и ОНГА показали, что паттерн экспрессии генов, характерный для ишемизированного сердца, частично сохраняется в ИМ-МКСк	82
3.1.8 Активация компонентов сигнального пути Notch и <i>Vmp2/Runx2</i> в мезенхимных клетках сердца при индукции гипоксии <i>in vitro</i>	89
3.1.9 Экзогенная активация сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца дозозависимо активирует <i>Runx2</i>	90
3.1.10 Обсуждение результатов по изучению механизмов активации регенеративного потенциала мезенхимных клеток сердца	91
3.2 Дерегуляция сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло.....	94
3.2.1 Мезенхимные клетки сердца от пациентов с тетрадой Фалло обладают альтернативным фенотипом	94
3.2.2 Экспрессия компонентов сигнального пути Notch изменена в ТФ-МКСч.....	95
3.2.3 Различия в паттерне экспрессии генов Notch в ТФ-МКСч, происходящих из правого предсердия и желудочка, незначительны	99
3.2.4 Уровень активации Notch связан с пролиферативной активностью ТФ-МКСч	103
3.2.5 Уровень активации Notch связан с более выраженной способностью к дифференцировке ТФ-МКСч	104
3.2.6 Notch дозозависимо способствует дифференцировке	107
3.2.7 Гипоксический стресс <i>in vitro</i> умеренно повышает экспрессию компонентов сигнального пути Notch.....	110
3.2.8 Обсуждение результатов по дерегуляции сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло.....	112
3.3 Взаимодействие между BMP2 и сигнальным путём Notch в эндотелиальном-мезенхимном переходе в контексте фиброза миокарда.....	116
3.3.1 Активация сигнальных путей Notch и BMP2 модулирует экспрессию целевых генов в МКСч и ПВЭК.....	116

3.3.2 Активация Notch и BMP2 индуцирует повышенный синтез α -SMA в клетках, за исключением ПВЭК в ответ на индукцию гена BMP2.....	118
3.3.3 Совместное культивирование МКСч и ПВЭК изменяет экспрессию генов-мишеней, и влияет на активацию гена <i>HEY1</i> и гена <i>BMP2</i> при двойной трансдукции культур МКСч/ПВЭК.....	122
3.3.4 Индукция синтеза α -SMA в МКСч модулируется активацией BMP2 и BMP2/NICD во время совместного культивирования и это коррелирует с экспрессией <i>SNAI2</i>	123
3.3.5 Обсуждение результатов взаимодействия между BMP2 и сигнальным путём Notch в эндотелиально-мезенхимном переходе.....	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
Список сокращений	134
Список литературы	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Сердечно-сосудистые заболевания находятся на первом месте среди причин инвалидизации и смертности в мире [1, 2]. По последним оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, в 2019 году от сердечно-сосудистых заболеваний погибло примерно 17,9 миллиона человек [3]. Большинство случаев были связаны с заболеваниями сердечной мышцы, подвергавшейся утрате и замене клеточного состава миокарда, и необратимым изменениям в структуре и функции самого органа. Современная классификация заболеваний миокарда различает коронарогенные и некоронарогенные заболевания, основываясь на причинах их развития. К первой группе относят заболевания, связанные с поражением коронарных артерий, а ко второй группе причисляют остальные болезни сердечной мышцы, в том числе врожденные и приобретенные пороки сердца и другие состояния, приводящие к вторичной перегрузке миокарда, например, кардиомиопатии [4].

Наиболее распространенными типами врожденных дефектов являются врожденные пороки сердца (ВПС), которые затрагивают около 8 новорожденных на 1000 во всем мире. Среди ВПС наиболее встречаемым синдромом является тетрада Фалло (ТФ), представляющая собой сложное и комплексное цианотическое заболевание, распространенность которого примерно составляет 1 случай на 3000 новорожденных [5]. ТФ имеет определенный морфологический фенотип в виде четырех пороков развития сердца, а именно: дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП), гипертрофия правого желудочка (ПЖ), сужение правого оттока (стеноз легких) и декстропозиция аорты к правой стороне над ДМЖП (первичная аорта). Благодаря хирургическому вмешательству в настоящее время удается устранить стеноз правого оттока и закрыть ДМЖП, что в результате позволяет выбрасывать насыщенную кислородом кровь исключительно через левый желудочек [6]. До сих пор этиология заболевания остаётся не до конца ясной ввиду сложности патогенеза, и поиск потенциальных генов-кандидатов, ассоциированных с фенотипом болезни, активно продолжается в настоящее время [7].

Среди коронарогенных заболеваний миокарда лидирующую позицию занимает прогрессирующая сердечная недостаточность, возникающая вследствие острого инфаркта. Развитие заболевания происходит по причине сужения просвета коронарной артерии, питающей миокард, что приводит к гибели кардиомиоцитов в очаге повреждения [8]. Постинфарктный миокард постепенно замещается фиброзной тканью из-за отсутствия возможности, как полагают, к функционально значимой регенерации [9]. В ходе прогрессирования заболевания происходят

процессы патологического ремоделирования и дилатации камер сердца, что становится причиной развития критической сердечной недостаточности [10].

Современные методы лечения ишемической болезни сердца сосредоточены на том, чтобы приостановить прогрессирование данного заболевания, не доводя до развития сердечной недостаточности. Например, реваскуляризация миокарда, шунтирующие операции и др. служат для улучшения кровоснабжения сердца после инфаркта миокарда. Помимо этого, активно используются фармакологические подходы, замедляющие или останавливающие патологическое ремоделирование сердца, такие как ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, β -блокаторы и другие. Тем не менее, смертность среди пациентов с сердечной недостаточностью всё ещё остаётся чрезмерно высокой, что свидетельствует о том, что традиционные методы лечения пока малоэффективны [11]. К тому же, данные подходы больше нацелены на купирование болезненных симптомов, а не обеспечивают полное и функциональное восстановление миокарда [12].

Важным вопросом остаётся поиск и изучение механизмов эндогенного восстановления сердечной мышцы в качестве перспективного терапевтического подхода на смену заместительным терапиям. В надежде найти эффективные методы регенерации сердца, исследователи обратили своё внимание на клеточную терапию. Среди первоначальных подходов осуществлялась трансплантация стволовых клеток «первого поколения», которые представляли собой неселективную клеточную суспензию в виде нефракционированных моноклеарных стволовых клеток, полученных из костного мозга. Этот шаг позволил рассмотреть эти операции в перспективе, но исследователям удалось лишь частично восстановить сердечную мышцу из-за трудностей с направленной дифференцировкой клеток [13].

Открытие эндогенного регенеративного потенциала сердца в 2003 году изменило представления научного сообщества о возможностях этого органа и дало толчок к рассмотрению использования резидентных стволовых клеток сердца в регенерации миокарда [14]. Это ознаменовало появление клеточной терапии «второго поколения». Согласно традиционным представлениям, сердце человека — окончательно дифференцированный орган; однако в сердце могут возникать очаги пролиферативной активности клеток, интенсивность которых возрастает в периинфарктной зоне [15]. Открытие сердечных стволовых клеток стимулировало разработку новых подходов в клеточной терапии миокарда, но способность этих клеток напрямую образовывать кардиомиоциты до сих пор остается спорной [16].

Оборот кардиомиоцитов в здоровом миокарде составляет примерно 0,5–2% в год, и эти цифры несколько увеличиваются при поражении сердца. Механизм обновления кардиомиоцитов в основном обусловлен повторным входением самих сократительных клеток в клеточный цикл,

а не за счёт дифференцировки мезенхимных клеток сердца [17]. Мезенхимные стволовые клетки (включая сердечные стволовые клетки), возможно, участвуют в регенеративных процессах в миокарде, высвобождая паракринные факторы, обеспечивающие защиту миокарда, неоваскуляризацию, ремоделирование и дифференцировку в сердце [18].

Имеются данные о том, что механизмы функционального восстановления миокарда заключены в паракринной межклеточной сигнализации, и их активация может происходить именно в период раннего ответа на повреждение. В связи с этим изучение механизмов ранней активации регенеративных процессов в постинфарктной ткани является актуальным вопросом. Хотя существование резидентных сердечных клеток-предшественников подвергается сомнению [19], ясно, что регенерация миокарда возможна, но механизмы остаются неизвестными.

Одним из предполагаемых молекулярных механизмов, вовлеченных в регенеративный ответ в миокарде, может являться сигнальный путь Notch. В ряде исследований на позвоночных было показано [20, 21], что регуляция передачи сигналов Notch может способствовать функциональному восстановлению сердечной функции за счёт снижения степени фиброза после поражения. К тому же была выявлена взаимосвязь между гипоксией и пролиферацией кардиомиоцитов у взрослых млекопитающих, что приводило к значительной регенерации миокарда в условиях системной гипоксемии [22]. Потенциальная связь между сигнальным путём Notch и гипоксией в механизмах восстановления сердечной мышцы остаётся не до конца ясной.

Таким образом, функциональное восстановление миокарда сердца после инфаркта остаётся актуальной проблемой современной регенеративной биомедицины. Поиск эффективной терапевтической стратегии все еще продолжается, и многие исследования направлены на изучение возможностей клеточной терапии миокарда, однако клеточные механизмы постинфарктного восстановления сердца до сих пор неясны. Данное исследование было направлено на анализ ранних транскрипционных событий в сердечной ткани после инфаркта миокарда и на изучение клеточной популяции, выделенной из постинфарктной ткани миокарда крыс. Также наше исследование было направлено на изучение дерегулируемых процессов, происходящих в мезенхимных клетках сердца у пациентов с синдромом Фалло. Цианотический врожденный порок сердца в виде тетрады Фалло остаётся одним из наиболее часто встречающихся и серьёзных дефектов развития сердца. До настоящего времени механизмы, лежащие в основе формирования тетрады Фалло, на клеточном и молекулярном уровнях, остаются неопределёнными.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлось изучение Notch-зависимых механизмов функциональной регуляции мезенхимных клеток сердца в контексте гипоксического воздействия на миокард при остром инфаркте и пороках развития.

Задачи:

1. Проанализировать ранние транскрипционные события, происходящие в постинфарктной ткани крыс, через 24 часа после индукции инфаркта миокарда.
2. Оценить экспрессию компонентов сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования в постинфарктной и здоровых тканях миокарда крыс на ранних временных точках – 8 и 24 часа после острого инфаркта.
3. Оценить экспрессию компонентов сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования в мезенхимных клетках, полученных из постинфарктной и интактной тканей миокарда крыс.
4. Сравнить экспрессию компонентов сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца человека, полученных от пациентов с тетрадой Фалло и в клетках от пациентов с дефектом межжелудочковой перегородки.
5. Оценить способность к миграции, пролиферации и дифференцировке постинфарктных и здоровых мезенхимных клеток сердца крыс, а также к пролиферации и дифференцировке мезенхимных клеток сердца человека, полученных от пациентов с тетрадой Фалло и дефектом межжелудочковой перегородки.
6. Проанализировать активацию сигнального пути Notch в условиях гипоксии *in vitro* в мезенхимных клетках сердца крыс и человека.
7. Оценить взаимодействие компонентов сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования в мезенхимных клетках сердца крыс и человека путём экзогенной активации передачи сигналов Notch и *BMP2*.

Научная новизна работы

В работе впервые охарактеризован транскрипционный профиль активированных мезенхимных клеток сердца крыс в ответ на острый гипоксический стресс, а также установлены молекулярные механизмы регуляции мезенхимных клеток сердца крысы и человека в виде дерегуляции эмбриональных сигнальных путей, таких как сигнальный путь Notch и Wnt.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе выявлены значимые изменения в транскрипционном профиле тканей постинфарктного миокарда, включая реактивацию эмбриональных сигнальных путей, что даёт ценную теоретическую информацию о клеточных механизмах, лежащих в основе постинфарктного ремоделирования сердца. Более того, активация ключевых компонентов сигнальных путей Notch и Wnt в постинфарктных тканях указывает на их решающую роль в раннем ремоделировании миокарда, что свидетельствует о наличии потенциальных мишеней для терапевтических вмешательств.

Открытие резидентных популяций активированных мезенхимных клеток в сердце после инфаркта миокарда, и возможность их выделить и культивировать *in vitro* имеет практическое значение. Данные клетки демонстрируют повышенную способность к пролиферации, миграции и дифференцировке по сравнению с популяциями интактных клеток, что указывает на их потенциал для регенеративной терапии. Кроме того, представленные профили экспрессии генов как постинфарктных мезенхимных клеток, так и мезенхимных клеток от пациентов с тетрадой Фалло дают ценную информацию о специфических нарушениях регуляции ряда генов, прокладывая путь для более целенаправленных диагностических и терапевтических подходов.

Основные научные результаты

1. Исследование показало [23], что острый гипоксический стресс вызывает реактивацию эмбриональных сигнальных путей, в частности Notch и Wnt, в мезенхимных клетках сердца после инфаркта миокарда, что свидетельствует о значимости гипоксии в клеточной активации, и указывает на наличие потенциальных мишеней для повышения регенеративной способности миокарда. В данной работе осуществлял всю экспериментальную часть с анализом данных и подготовкой текста рукописи для публикации (с. 53–68), за исключением работ по индукции инфаркта миокарда у крыс, проводившихся на базе Центра экспериментальной фармакологии СПХФА при участии

Карпова Андрея Александровича.

2. В работе было показано [24], что инфаркт миокарда способствует активации мезенхимных клеток сердца, о чем свидетельствует их повышенная пролиферативная способность, повышенная миграционная способность и повышенная экспрессия маркеров дифференциации в ответ на индукцию, по сравнению с клетками из здоровой ткани миокарда. В данной работе осуществлял всю экспериментальную часть с анализом данных и подготовкой текста рукописи для публикации (с. 69–77).
3. Данная работа продемонстрировала [25] взаимодействие между сигнальным путём Notch и Vmp2 в регуляции маркеров эндотелиально-мезенхимного перехода, раскрывая их тканеспецифичность на примере мезенхимных клеток сердца и эндотелиальных клеток пупочной вены человека, тем самым подчеркивая критическую роль этого взаимодействия в формировании фиброза сердца. В данной работе осуществлял всю экспериментальную часть с анализом данных и подготовкой текста рукописи для публикации (с. 116–126).
4. Исследование выявило [26] нарушение регуляции активности пути Notch в мезенхимных клетках сердца, полученных от пациентов с тетрадой Фалло, по сравнению с контролем, предполагая потенциальную роль сигнального пути Notch в патогенезе заболевания и подчеркивая его значение для функционального состояния этих клеток. В данной работе осуществлял проведение исследований *in vitro* и принимал участие в анализе данных (с. 95–111), за исключением работ, связанных с забором материала от пациентов с пороками развития сердца, при участии Козырева Ивана Александровича.
5. Исследование показывает [27], что мезенхимные клетки сердца пациентов с дефектами межжелудочковой перегородки и тетрадой Фалло демонстрируют различия в экспрессии поверхностных маркеров CD90 и PDGFRB, что указывает на влияние патологии на их фенотип. В данной работе принимал участие в проведении исследований *in vitro* (с. 94).
6. В обзоре [28] подчеркиваются неоднозначные результаты лечения сердечной недостаточности на основе стволовых клеток, отмечается их безопасность, но ограниченная эффективность в улучшении сердечной функции, тем самым подчеркивая необходимость продолжения разработки клеточной терапии следующего поколения. В данной работе осуществлял подготовку и оформления текста публикации (с. 31–37).
7. Обзор показывает [29], что, хотя прямая дифференциация резидентных мезенхимных клеток сердца в кардиомиоциты дискутируется, их использование для улучшения

функции сердца после инфаркта миокарда подчеркивает потенциал как этих клеток, так и терапии индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками в регенеративной медицине, подчеркивая важность дальнейших исследований их механизмов и терапевтической роли. В данной работе осуществлял подготовку и оформления текста публикации (с. 30–31).

Положения, выносимые на защиту

1. Транскрипционный профиль постинфарктных тканей миокарда значительно изменяется через 24 часа после поражения, и приводит к реактивации эмбриональных сигнальных путей, таких как Notch и *Vmp* (*Runx2/Vmp2*), что может указывать на их ключевую роль в процессах раннего ремоделирования миокарда после инфаркта.
2. Инфаркт миокарда приводит к активации резидентных популяций мезенхимных клеток сердца, которые можно выделить из постинфарктного участка и культивировать с временным сохранением их свойств в виде улучшенной способности к пролиферации, миграции и дифференцировке *in vitro*. Также мезенхимные клетки сердца от пациентов с тетрадой Фалло имели большую склонность к пролиферации и дифференцировке, чем клетки от пациентов с изолированным дефектом межжелудочковой перегородки.
3. Транскрипционный профиль постинфарктных мезенхимных клеток сердца отличается от здоровых клеток, и частично сохраняется генная экспрессия, характерная для ишемизированной ткани, в том числе в постинфарктных клетках выражена экспрессия компонентов сигнального пути Notch (*Jag1*, *Hes1*) и *Vmp2/Runx2*. К тому же, значительная дерегуляция сигнального пути Notch также была выявлена в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло.
4. Гипоксический стресс *in vitro* оказывает стимулирующее воздействие на активацию компонентов сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования *Vmp2/Runx2* в здоровых мезенхимных клетках сердца крыс и человека.
5. Экзогенная активация *NOTCH1* приводит к дозозависимому повышению экспрессии компонентов сигнального пути Notch и *RUNX2* в здоровых мезенхимных клетках сердца крыс и человека, и не влияет на экспрессию *VMP2*.
6. Уровни экспрессии компонентов сигнального пути Notch влияют на выраженность пролиферативных и дифференцировочных процессов в мезенхимных клетках сердца человека, а дозозависимая активация Notch усиливает способность в них способность к дифференцировке в кардиогенном направлении;

7. Попеременная активация *NOTCH1* и *BMP2* влияет на экспрессию генов-маркеров эндотелиально-мезенхимного перехода и синтез альфа-актина, и способствует активации мезенхимных клеток сердца человека.

Публикации и апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 20 работ: 7 научных статей в журналах, индексируемых системами РИНЦ, WoS и/или Scopus, и 13 публикаций в материалах международных и всероссийских конференций.

Основные положения и научные итоги диссертации были изложены в докладах на научных конференциях:

1. III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 15–18 ноября 2017 года, Москва, Россия.
2. XVIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, 11–16 марта 2017 года, Санкт-Петербург, Россия.
3. Клеточная биология: проблемы и перспективы, 2–6 октября 2017 года, Санкт-Петербург, Россия.
4. XI ежегодная научная конференция молодых ученых и специалистов, НМИЦ им. В. А. Алмазова, 27–28 апреля 2017 года, Санкт-Петербург, Россия.
5. The Frontiers in CardioVascular Biology, 20-22 апреля 2018 года, Вена, Австрия.
6. Всероссийская молодежная медицинская конференция с международным участием «Алмазовские чтения – 2018», 16–18 мая 2018 года, Санкт-Петербург, Россия.
7. Всероссийская Конференция с Международным Участием “StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа клеточных технологий”, 15–17 ноября 2018 года, Санкт-Петербург, Россия.
8. Алмазовский молодежный медицинский форум, 16–18 мая 2018 года, Санкт-Петербург, Россия.
9. The Notch Meeting XI, 6–10 октября 2019 года, Афины, Греция.
10. I Всероссийский Конгресс с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования», 04–07 ноября 2019 г., Кемерово, Россия.
11. IV Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 20–23 ноября 2019 года, Москва, Россия.
12. Конференция «Актуальные проблемы биологии развития», 12–14 октября 2021, Москва,

Россия.

13. Форум молодых кардиологов “От профилактики к высокотехнологичной помощи при сердечно-сосудистых заболеваниях”, 13–14 мая 2022, Москва, Россия.

Диссертация была рекомендована к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по результатам изложения основных результатов и их обсуждения на семинаре Института цитологии РАН, 24.01.2024.

Список статей, опубликованных в журналах, индексируемых системами РИНЦ, WoS и/или Scopus:

1. **Докшин, П. М.**, Карпов, А. А., Эйвазова, Ш. Д., Пузанов, М. В., Костарева, А. А., Галагудза, М. М., Малашичева, А. Б. Активация стволовых клеток сердца при инфаркте миокарда. Цитология. 2018; 60 (2), 81–88. <https://doi.org/10.31116/tsitol.2018.02.02>

Dokshin, P. M., Karpov, A. A., Eyvazova, S. D., Puzanov, M. V., Kostareva, A. A., Galagudza, M. M., Malashicheva, A. B. Activation of Cardiac Stem Cells in Myocardial Infarction. Cell and Tissue Biology. 2018; 12 (3), 175–182. <https://doi.org/10.1134/S1990519X18030045>
2. Козырев И.А., Головкин А.С., Игнатъева Е.С., **Докшин П.М.**, Грехов Е.В., Гордеев М.Л., Первунина Т.М., Костарева А.А., Малашичева А.Б. Фенотипическая характеристика мезенхимных клеток сердца, полученных от пациентов с тетрадой Фалло и дефектом межжелудочковой перегородки. Трансляционная Медицина. 2019;6(5), 16–23. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2019-6-5-16-23>
3. Ivan Kozyrev, **Pavel Dokshin**, Aleksandra Kostina, Artem Kiselev, Elena Ignatieva, Alexey Golovkin, Tatiana Pervunina, Evgeny Grekhov, Mikhail Gordeev, Anna Kostareva & Anna Malashicheva. Dysregulation of Notch signaling in cardiac mesenchymal cells of patients with tetralogy of Fallot. Pediatric Research. 2020; 88, 38–47. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0760-6>
4. **Докшин П.М.**, Бейркдар А., Малашичева А.Б. Современные проблемы и перспективы развития клеточной терапии на основе мезенхимных клеток сердца в восстановлении сократительной функции миокарда. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2021;10(3):72–78. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2021-10-3-72-78>

5. **Докшин П.М.**, Малашичева А.Б. Стволовые клетки сердца: надежда или миф? Российский кардиологический журнал. 2021;26(10):4749. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2021-4749>
6. **Docshin, P.M.**; Karpov, A.A.; Mametov, M.V.; Ivkin, D.Y.; Kostareva, A.A.; Malashicheva, A.B. Mechanisms of Regenerative Potential Activation in Cardiac Mesenchymal Cells. Biomedicines. 2022; 10, 1283. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061283>
7. **Docshin P**, Bairqdar A, Malashicheva A. Interplay between BMP2 and Notch signaling in endothelial-mesenchymal transition: implications for cardiac fibrosis. Stem Cell Investig 2023;10:18. <https://doi.org/10.21037/sci-2023-019>

Тезисы:

1. **Докшин, П.**, Малашичева, А., & Карпов, А. (2017). Влияние гипоксии на потенциал стволовых клеток сердца в регенерации миокарда. Гены & Клетки, XII (3), 86. III Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 15-18 ноября 2017 года, Москва, Россия.
2. **Докшин П.М.**, Малашичева А.Б. (2017). Роль гипоксии в индукции репаративных свойств стволовых клеток сердца. XVIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии, 11–16 марта 2017 года, Санкт-Петербург, Россия.
3. **Докшин П.М.**, Малашичева А.Б. (2017). Активация репаративных свойств стволовых клеток сердца при остром инфаркте миокарда. Клеточная биология: проблемы и перспективы, 2–6 октября 2017 года, Санкт-Петербург, Россия.
4. **Докшин П.М.** (2017). Роль гипоксии в индукции репаративных свойств стволовых клеток сердца. XI ежегодная научная конференция молодых ученых и специалистов, НМИЦ им. В.А. Алмазова, 27-28 апреля 2017 года, Санкт-Петербург, Россия.
5. **Dokshin, P.**, Karpov, A., Eyvazova, S., & Malashicheva, A. (2018). Hypoxia activates stem cells in myocardial tissue. Cardiovascular Research, 114(suppl_1), S66–S71. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy060> The Frontiers in Cardiovascular Biology, 20-22 апреля 2018 года, Вена, Австрия.

6. **Докшин П.М.** (2018). Активация сигнального пути Notch в периинфарктной зоне миокарда при остром инфаркте. Всероссийская молодежная медицинская конференция с международным участием «Алмазовские чтения – 2018», 16–18 мая 2018 года, Санкт-Петербург, Россия.
7. **Докшин, П., & Малашичева, А.** (2018). Оценка уровня активации мезенхимальных клеток сердца под влиянием гипоксии *in vitro*. Сборник Материалов Всероссийской Конференции с Международным Участием “StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа клеточных технологий”, 15–17 ноября 2018 года, Санкт-Петербург, Россия.
8. **Докшин П.М.** (2018). Активация мезенхимальных стволовых клеток сердца под влиянием гипоксии. Алмазовский молодежный медицинский форум, 16–18 мая 2018 года, Санкт-Петербург, Россия.
9. **Dokshin, P., Karpov, A., Malashicheva, A.** (2019). Notch-Dependent Mechanisms of Regenerative Potential Activation in Cardiac Mesenchymal Cells. The Notch Meeting XI, 6-10 октября 2019 года, Афины, Греция.
10. **Докшин, П.М., Карпов, А.А., Малашичева, А.Б.** (2019). Notch-зависимые механизмы активации регенеративного потенциала мезенхимных клеток сердца. <https://www.doi.org/10.17802/2306-1278> I Всероссийский Конгресс с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования», 04-07 ноября 2019 г., Кемерово, Россия.
11. **Докшин, П. М., Карпов, А. А., & Малашичева, А. Б.** (2019). Активация сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования в мезенхимных клетках сердца при остром гипоксическом стрессе. Гены & Клетки, 78. IV Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 20–23 ноября 2019 года, Москва, Россия.
12. **Докшин П.М., Малашичева А.Б.** (2021). Поиск молекулярных мишеней, вовлеченных в регенеративный ответ при инфаркте миокарда, в мезенхимных клетках сердца с применением транскриптомного анализа. Актуальные проблемы биологии развития, 12–14 октября 2021, Москва, Россия.
13. **Докшин П.М., Панферов Е.В., Малашичева А.Б.** (2022). Взаимодействие сигнальных путей Notch и Wnt в регенеративных процессах сердца. Форум молодых кардиологов “От

профилактики к высокотехнологичной помощи при сердечно-сосудистых заболеваниях”, 13–14 мая 2022, Москва, Россия.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Развитие сердца

В ходе эмбриогенеза позвоночных животных первым функциональным органом становится сердце, которое формируется из клеток-предшественников в процессе ранней гаструляции. Клетки-предшественники сердца возникают на стадии первичной полоски позади гензеновского узелка и занимают два небольших участка, по одному с каждой стороны эпибласта, и доходят до половины длины полоски. Мигрировав через первичную бороздку, они образуют две группы мезодермальных клеток боковой пластинки [30]. Спецификация сердечного поля начинается в ходе миграции, и сопровождается появлением кардиогенной мезодермы, формирующей двойную стенку первичной сердечной трубки, которая состоит из двух слоёв: внутреннего эндокардиального слоя с эндотелиальными клетками и наружного миокардиального слоя, разделённых между собой внеклеточным матриксом [31]. Далее происходит формирование первой структуры под названием подушка атриовентрикулярного канала, которая регулирует поток крови между предсердием и желудочком, даёт начало трёхстворчатому, митральному клапанам и части атриовентрикулярной перегородки. На этой стадии начинаются первые ритмические сердечные сокращения.

Выделяют первичное и вторичное сердечные поля, которые дают начало определённым областям формирующегося органа [32]. Клетки-предшественницы первичного сердечного поля образуют первичную сердечную трубку. Она даёт начало левому и правому желудочкам сердца, но образующие её клетки обладают ограниченной способностью к пролиферации, что позволяет сформировать только большую часть левого желудочка сердца [30]. Клетки-предшественницы вторичного сердечного поля на заднем конце сердечной трубки образуют два предсердия (**Рисунок 1**), а на переднем конце формируют правый желудочек и выносящий тракт (артериальный конус и артериальный ствол) [31]. В последующем процессе петлеобразования сердце приобретает уже четырёхкамерную структуру, когда предсердия смещаются вперёд от желудочков.

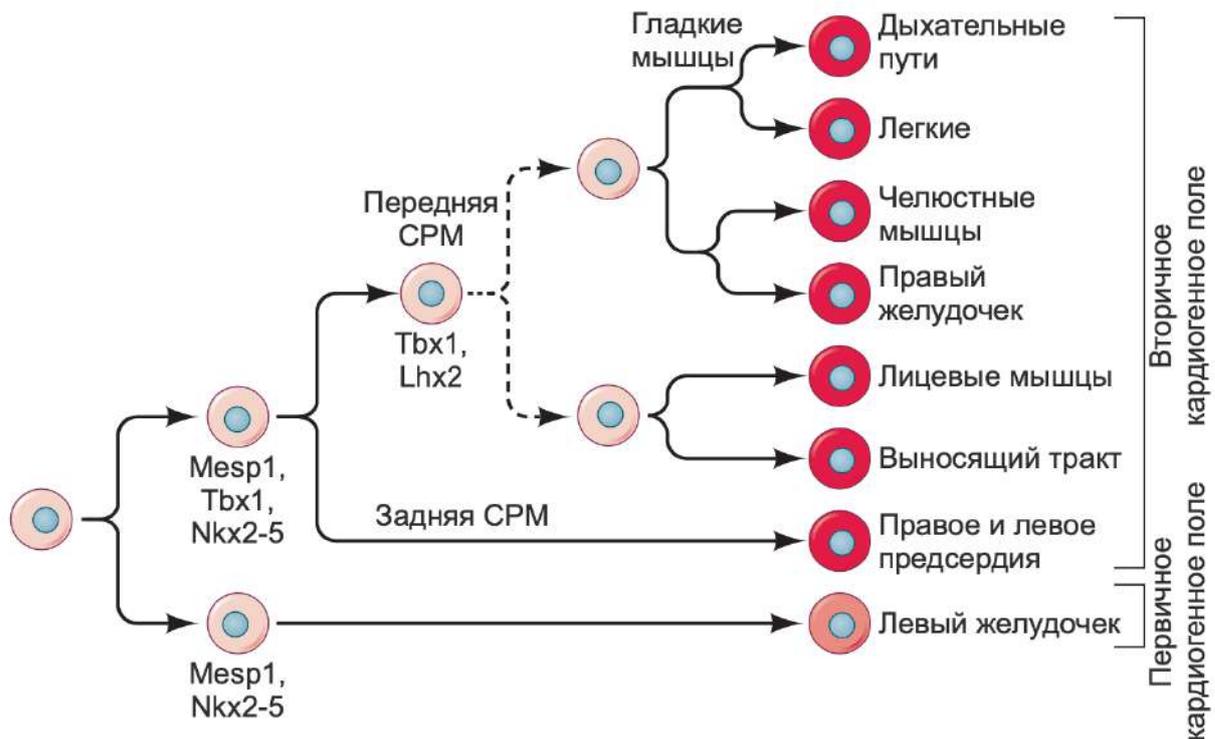


Рисунок 1. Гипотетическая схема развития клеток-предшественников сердца, происходящих из первичного и вторичного сердечных полей. Пунктирная линия указывает на то, что точных данных о разделении клеток-предшественников лёгких, их сосудов, лицевых мышц и сердца пока не получено. Некоторые факторы транскрипции, связанные с этими клетками-предшественниками, перечислены под ними [30].

Несмотря на специфичность клеток-предшественниц сердца, они обладают высокой пластичностью и способностью замещать друг друга в процессе дифференцировки и образовывать любые типы клеток сердца. К тому же, среди клеток-предшественниц вторичного сердечного поля ещё встречаются клетки, которые вовлечены в формирование мышц лица, легочных артерий и вен, а также легочной мезенхимы [30]. В механизмах спецификации кардиальной мезодермы и развитии органа принимают участие множество эмбриональных сигнальных путей, от которых зависит правильное формирование структур и органа в целом. Одним из значимых сигнальных путей, вовлеченных в данные процессы, является сигнальный путь Notch.

1.2 Сигнальный путь Notch

В развитии организма человека участвуют несколько эволюционно консервативных сигнальных путей, таких как Notch, Wingless, Hedgehog, трансформирующий фактор роста β и

другие. Это классическая группа молекулярных механизмов, которые могут действовать как индивидуально, так и координировать друг друга [33]. Одним из значительных сигнальных путей в формообразовании и морфогенезе является сигнальный путь Notch, который отвечает за многочисленные процессы развития, в том числе поддержание популяций стволовых клеток и тканевого гомеостаза в постнатальном периоде. Передача сигналов Notch играет центральную роль в выборе клеточной судьбы, тем самым участвуя в дифференцировке таких типов клеток как эпителиальные, нейрональные, эндотелиальные и клеток крови, костей, мышц. Любые отклонения в межклеточной сигнализации Notch приводят к различным аномалиям развития человека или образованию опухоли [34], поэтому регуляция интенсивности и длительности сигнала Notch, является неременным условием для активного изучения этого механизма клеточной регуляции.

Этот ключевой регулятор клеточной судьбы смогли выявить во многих организмах начиная с просто устроенной нематоды *C. elegans* в виде гена-ортолога Notch, что в свою очередь, указывает на то, что это высоко консервативная передача сигналов. В состав сигнального пути Notch входят белки-рецепторы, лиганды к этим белкам, гены-мишени и транскрипционный комплекс. У млекопитающих встречаются только четыре разновидности трансмембранных рецепторов Notch (Notch-1,2,3,4), каждый из которых состоит из трёх доменов: внутриклеточный, трансмембранный и внеклеточный, а также выделяют 5 типов трансмембранных лигандов (три вида Delta-like белка (Dll-1,2,4) и два вида Jagged белка (Jagged-1,2)) [35].

Механизм работы канонического сигнального пути Notch заключается в следующем: лиганд DSL (Delta, Serrate, Lag2) связывается с рецептором Notch, локализуемым на поверхности соседней клетки, после чего начинается двухступенчатый процесс протеолитического расщепления домена трансмембранного рецептора Notch. Посредством инициации металлопротеиназ ADAM/TACE, происходит высвобождение внутриклеточного домена Notch (NICD) в цитоплазму. NICD проникает в ядро клетки, где связывается с транскрипционным фактором семейства CSL (CBF1/RBPJK у млекопитающих, Su(H) у мух, и LAG-1 у червей) и формируют транскрипционный комплекс вместе с белками ICN и Mastermind семейства (MAM/L)ag-3, который является ко-активатором процесса. Затем они активируют гены-мишени с помощью дополнительного ко-активатора, p300, и опосредуют активацию транскрипции на матрице хроматина при помощи ICN [36] (**Рисунок 2**).

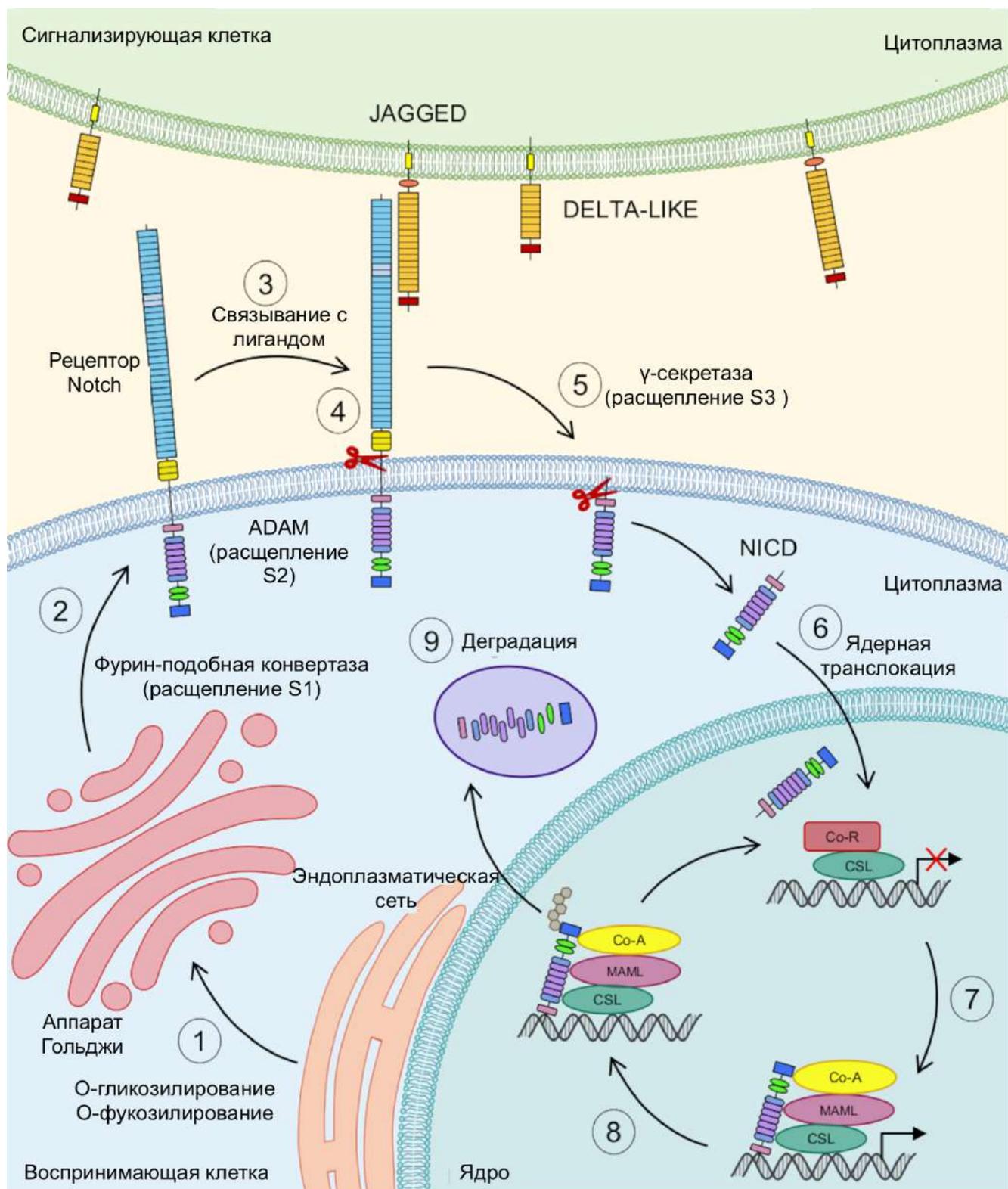


Рисунок 2. Канонический сигнальный путь Notch. 1) Рецептор Notch после трансляции модифицируется путём гликозилирования и фукозилирования в эндоплазматическом ретикулуме. 2) В комплексе Гольджи продолжается модификация рецептора, которая будет заключаться в расщеплении рецептора Notch в положении S1 за счёт фуриноподобной конвертазы. 3) Лиганды к рецептору Notch, способные его активировать, представлены двумя типами: JAGGED и DELTA-LIKE. 4) Активация Notch происходит путём связывания лиганда одной клетки с рецептором другой клетки, в результате чего рецептор подвергается расщеплению протеазой из семейства белков, содержащих домены дезинтегрина и металлопротеазы (ADAM10 или ADAM17) в

положении S2. 5) Белковый комплекс γ -секретаза выполняет последующее расщепление по S3 (валин 1744 в Notch1 человека и мыши), высвобождая внутриклеточный домен рецептора Notch (NICD) в цитоплазму. 6) NICD транслоцируется в ядро. 7) В ядре NICD связывается с ДНК-связывающим фактором транскрипции CBF1, супрессором *hairless*, *Lag-1* (CSL). После связывания NICD вытеснит корепрессоры и рекрутирует коактиваторы транскрипции, такие как *Mastermind/Lag-3* (MAML). Этот процесс позволяет регулировать нижележащие гены-мишени Notch. 8) NICD подвергается убиквитинированию с помощью супрессора/энхансера убиквитинлигазы E3 *Lin-12* (SEL-10), тем самым направляя его на деградацию. 9) NICD расщепляется протеасомой [37].

Наиболее известными генами-мишенями Notch являются члены семейства генов «Hairy and enhancer-of-split» (*HES*) и «Hairy and enhancer-of-split-related» (*HEY*, *HESR*, *HRT*, или *CHF*). Многие из этих генов-репрессоров подавляют гены, которые необходимы для дифференцировки клеток. Одним из наиболее изученных функций передачи сигналов Notch является латеральное торможение, которое блокирует возможность окружающим клеткам принять ту же самую судьбу [38].

Латеральное торможение представляет собой процесс нарушения симметрии, при котором популяция идентичных клеток дифференцируется в разные типы клеток путём чередования. В этот процесс включена локальная конкуренция между соседними клетками, которые в одно и то же время стремятся дифференцироваться в один и тот же тип клеток, и в это же время не позволяют своим «соседям» выбрать ту же самую судьбу. В каждой небольшой группе клеток преобладает одна клетка, которая подавляет своих непосредственных «соседей» с помощью сигнального пути Notch [39]. Существуют три основные модели латерального торможения: классическое латеральное торможение, формирование паттерна за счёт цис-ингибирования, паттернирование с помощью филоподий (**Рисунок 3**).

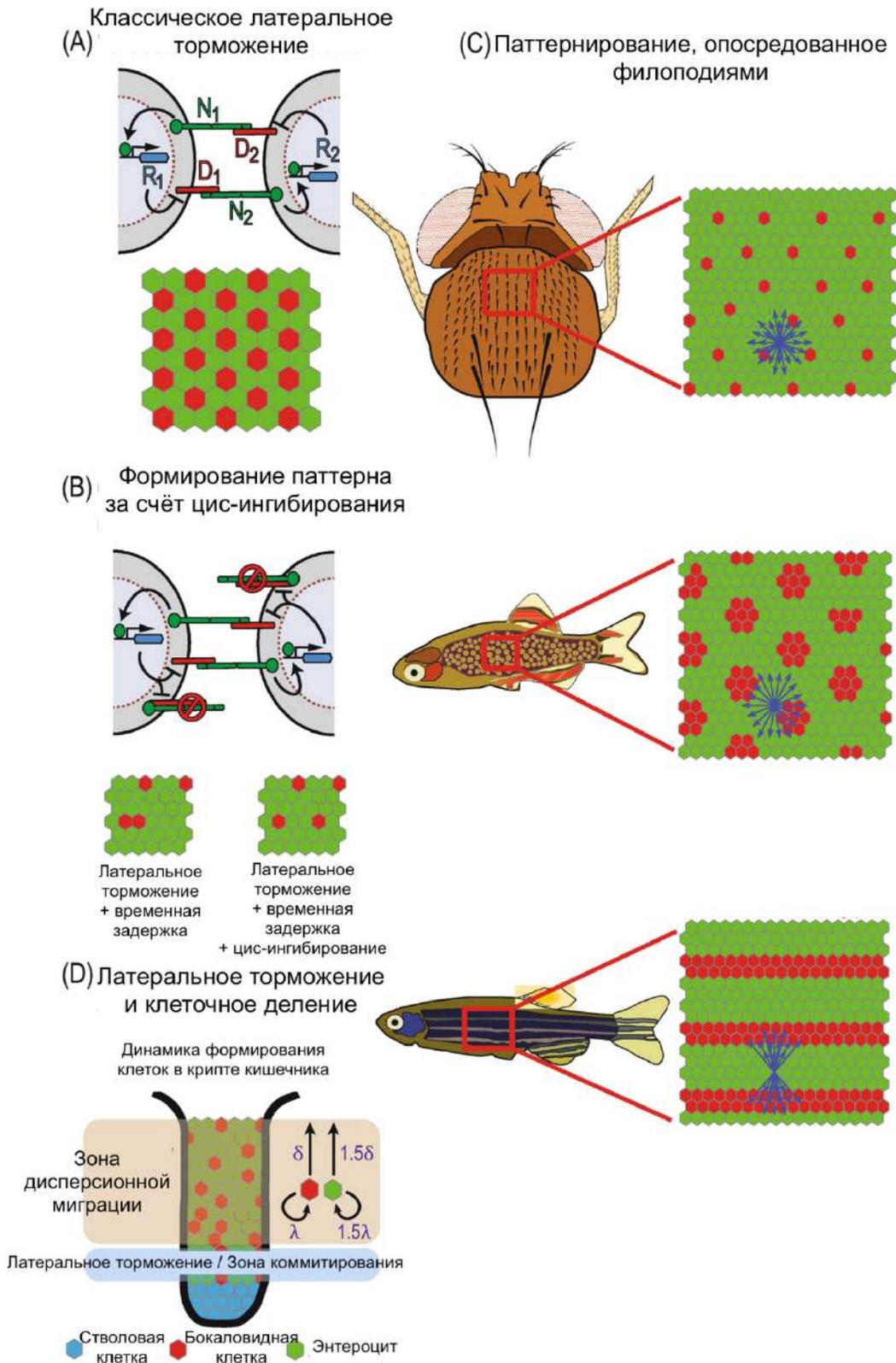


Рисунок 3. Модели латерального торможения. а) «Классическое» латеральное торможение. Вверху – схематическое изображение молекулярного взаимодействия при латеральном торможении между двумя клетками. В этой схеме передача сигналов NOTCH в каждой клетке активируется взаимодействием между рецепторами NOTCH (N_1 и N_2) и лигандами NOTCH (D_1 и D_2). Передачу сигналов NOTCH в каждой клетке активирует репрессор (R_1 и R_2), который подавляет экспрессию или активность DELTA в этой клетке. Внизу — результат в виде типичной модели шестиугольной решетки клеток. (б) Формирование паттерна за счёт цис-ингибирования.

Вверху – схематическое изображение модели латерального торможения, включающей цис-ингибирование между рецепторами и лигандами. В модели цис-ингибирования лиганд на одной клетке связывается с рецептором на той же клетке, что приводит к образованию неактивного комплекса. Эти клеточно-автономные взаимодействия уменьшают количество свободных лигандов и рецепторов на клеточной поверхности. Внизу – цис-ингибирование снижает вероятность событий, когда две соседние клетки выбрали одну и ту же судьбу (красные клетки). (с) Паттернирование, опосредованное филоподиями. Схемы моделей, которые учитывают передачу сигналов NOTCH на большие расстояния за счёт филоподий. (d) Латеральное торможение и деление клеток. Схематическая модель, описывающая динамику дифференцировки в криптах толстой кишки. Стволовые клетки в нижней части крипты (синие) дифференцируются в бокаловидные клетки (красные, высокая дельта) и энтероциты (зеленые, низкая дельта), которые мигрируют к верхней части крипты (просвету). Стволовые клетки делятся в основании крипты (слоя стволовых клеток), приводя к движению клеток вверх. Латеральное торможение происходит в слое, прилегающем к слою стволовых клеток (зона латерального торможения или зона коммитирования). На этом уровне выбор судеб клеток определяется процессом латерального торможения, как описано в (а). После дифференцировки клетки мигрируют из зоны коммитирования в зону дисперсионной миграции. В этой зоне бокаловидные клетки делятся с меньшей скоростью (λ) и мигрируют с меньшей скоростью (δ) по сравнению с энтероцитами ($1,5\lambda$ и $1,5\delta$) [39].

В кроветворной системе передача сигналов Notch оказывает значительное влияние на функции гемопоэза. Например, во внутриутробном периоде Notch1 отвечает за индукцию definitivoного гемопоэза эндотелиальных клеток дорсальной аорты, а в постнатальном периоде в незначительной степени участвует в поддержании гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. Также Notch является ключевым регулятором раннего развития Т-клеток в тимусе [40].

В дифференцировке эндотелиальных клеток также принимает участие сигнальный путь Notch, но совместно с ещё одним важным регуляторным элементом - костным морфогенетическим белком (BMP). Между ними образуется непосредственно синергическое взаимодействие, например, в активации транскрипции *HESR* и *HERP2* в эндотелиальных клетках. Кроме того, переменный синергизм и антагонизм между BMP и Notch сигнальными путями отвечают за миграцию эндотелиальных клеток [41].

Нарушения в регуляции передачи сигналов Notch приводят к различным лёгочным заболеваниям, включая рак лёгких. Известно, что сигнальный путь Notch играет важную роль в координации событий во время развития лёгких, таких как выбор терминальной дифференцировки эпителиальных клеток в дыхательных путях и развития легочных сосудов [42].

Также передача сигналов Notch участвует в дифференциации и морфогенезе центральной нервной системы. Непосредственное влияние Notch наблюдается при разделении эпидермальных и нейрональных клеточных линий в ходе дифференцировки. Происходит инактивация передачи сигналов Notch, что приводит к образованию нейрогенного фенотипа у нейрональных клеток-

предшественников. Таким образом, сигнальный путь Notch может поддерживать популяцию клеток-предшественниц, ингибируя их преждевременную дифференцировку. Тем не менее, было установлено, что сигнальный путь Notch в центральной нервной системе может регулировать диверсификацию пула клеток-предшественников и нейронального созревания [43, 44].

Почки являются органами человека, ответственными за фильтрацию и поддержание химического баланса в организме. Они участвуют в выведении метаболитов и регулируют уровень электролитов в крови и её pH. Основной структурной и функциональной единицей почек является нефрон, развитие которого контролируется сигнальным путем Notch в процессе эмбриогенеза. Сигнальный путь Notch играет значимую роль как в недифференцированных, так и в зрелых клетках нефрона. Важно отметить, что в эмбриональном развитии этот путь сигнализации имеет критическое значение для дифференцировки клеток предпочки и формирования вторичной почки [45].

В образовании скелета выделяют несколько стадий развития, в которых задействована передача сигналов Notch, как важного регулятора в развитии сегментации дорсальной части мезодермы на сомиты, формировании и дифференциации прехондрогенных клеток в склеротоме для последующего обеспечения надлежащего развития осевого скелета. В дальнейшем, было установлено, что сигнальный путь Notch отвечает за регуляцию сомитогенеза, хондрогенеза, остеобластогенеза и остеокластогенеза, что в конечном счёте влияет на образование всего скелета в целом. Дерегуляция сигнального пути в эмбриогенезе приводит к необратимым изменениям скелета в виде врожденных пороков развития [46].

Базальный слой эпидермиса кожи состоит из пролиферирующих клеток-предшественников, которые ответственны за образование дифференцированных клеточных пластов для обеспечения барьера между внутренней и внешней средой. Эпидермис сохраняется на протяжении всей жизни посредством пролиферации и дифференциации стволовых клеток благодаря высоко консервативному сигнальному пути Notch, который играет существенную роль в дифференцировке клеток в эмбриогенезе и в постнатальном периоде [47].

В развитии волосяных фолликулов принимает участие сигнальный путь Notch, но только в постнатальном периоде. Он отвечает за регуляцию образования самой луковицы и внешней оболочки корня, а также в дифференцировке стволовых клеток или их предшественников путем стимуляции, или торможения в эпидермальную сторону. Сигнальный путь Notch регулирует дифференцировку клеток, обеспечивая правильное развитие каждого слоя стержня волоса и внутренней оболочки корня [48].

Латеральное торможение окружающих клеток, как основополагающая функция сигнального пути Notch, применяется в развитии сенсорных участков внутреннего уха при

формировании мозаичной структуры из чувствительных волосковых клеток и несенсорных опорных клеток. Два лиганда Notch (*Dll-1* и *Jagged2*), как полагают, действуют синергетически на стадии диверсификации клеток у млекопитающих. Передача сигнала Notch имеет индуктивный, а не ингибиторный, характер в определении просенсорной области, которой предшествует клеточная диверсификация чувствительных волосковых клеток и опорных клеток при помощи *Jagged1*, как одного из важнейших лигандов в этом процессе [49].

Раковыми стволовыми клетками являются некоторые субпопуляции раковых клеток с выраженными свойствами стволовых клеток, которые были идентифицированы в широком диапазоне онкологических заболеваний человека. Они характеризуются способностью к самообновлению и могут быть гетерогенными. Одним из общих свойств между раковыми стволовыми клетками и нормальными стволовыми клетками является их значительная зависимость от определенных сигнальных путей. Основными сигнальными путями стволовых клеток являются *Wnt*, *Notch* и *Hedgehog*, которые также ответственны за регуляцию самообновления и выживания раковых клеток [50].

1.3 Сигнальный путь Notch в развитии сердца

Спецификация кардиальной мезодермы во многом зависит от сигнального пути Notch. Передача сигналов, опосредованная рецепторами, лигандами и генами-мишенями Notch, регулирует процессы определения лево-правой оси, и, соответственно, правильного перекручивания сердечной трубки [51]. В атриовентрикулярном канале (АВК) происходит экспрессия костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*) и транскрипционного фактора T-box 2 (*TBX2*). Причём дефицит *BMP2* приводит к появлению дефектов АВК, в отличие от *TBX2*, подавление которого сводится к началу экспрессии канал-специфичных миокардиальных генов в АВК. В этом процессе принимают непосредственное участие гены-мишени Notch - *HEY1* и *HEY2*, действие которых приводят к ограничению экспрессии *BMP2* и *TBX2* в АВК. Исследование роли сигнального пути Notch в развивающемся сердце у мышей показали, что экспрессия *Hey2* и *Hey1* происходит в миокарде камер предсердий и желудочков, тогда как их экспрессия в атриовентрикулярном канале полностью отсутствует, что является важным свойством для правильной дифференциации миокарда [52]. При выключении этих генов возникают тяжелые пороки сердца, утончение миокарда и полное отсутствие артериальной дифференцировки, что, в свою очередь, приводит к летальному исходу эмбрионов. При рассмотрении этих взаимосвязей было обнаружено, что экспрессия лиганда *Vmp2* наблюдалась от АВК до миокарда предсердия при выключенном гене *Hey1*, тогда как в «диком типе»

экспрессия *Bmp2* была только в миокарде АВК. Эксперимент с проведением избыточной экспрессией конститутивно-активного внутриклеточного домена *Notch1* у мышей вызвал активацию экспрессии *Hey1* и *Hey2*, и подавление экспрессии *Bmp2* в миокарде АВК, что привело к образованию трабекул и дифференциации миокарда АВК в миокард желудочка. Таким образом, экспрессия генов *Hey* в миокарде предсердия и желудочка создает границу между АВК и камерами миокарда [53].

Тканевые взаимодействия между миокардом и эндокардом в районах АВК и выносящего тракта приводят к эпителиально-мезенхимному переходу (ЭМП) эндокардиальных клеток. На этом этапе происходит экспрессия рецепторов *NOTCH1-2,4*, лигандов *JAGGED1* и *DLL4*, и генов-мишеней *HEY1* и *HEY2* в эндокарде АВК. Таким образом, сигнальный путь Notch может регулировать начальные события ЭМП, а также способствовать приобретению мезенхимной морфологии клеток в ходе направленной экспрессии различных генов-мишеней [54] (**Рисунок 4**).

Сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF также является одним из ключевых регуляторов ЭМП в АВК. При индукции вынужденной экспрессии VEGF165 в миокардиальных клетках АВК до развития сердечной подушки приводит к чрезмерной пролиферации эндокардиальных клеток, снижению ЭМП и задержки слияния сердечной подушки [55]. Исходя из этого, VEGF является негативным регулятором ЭМП и способствует формированию эндокардиального фенотипа.

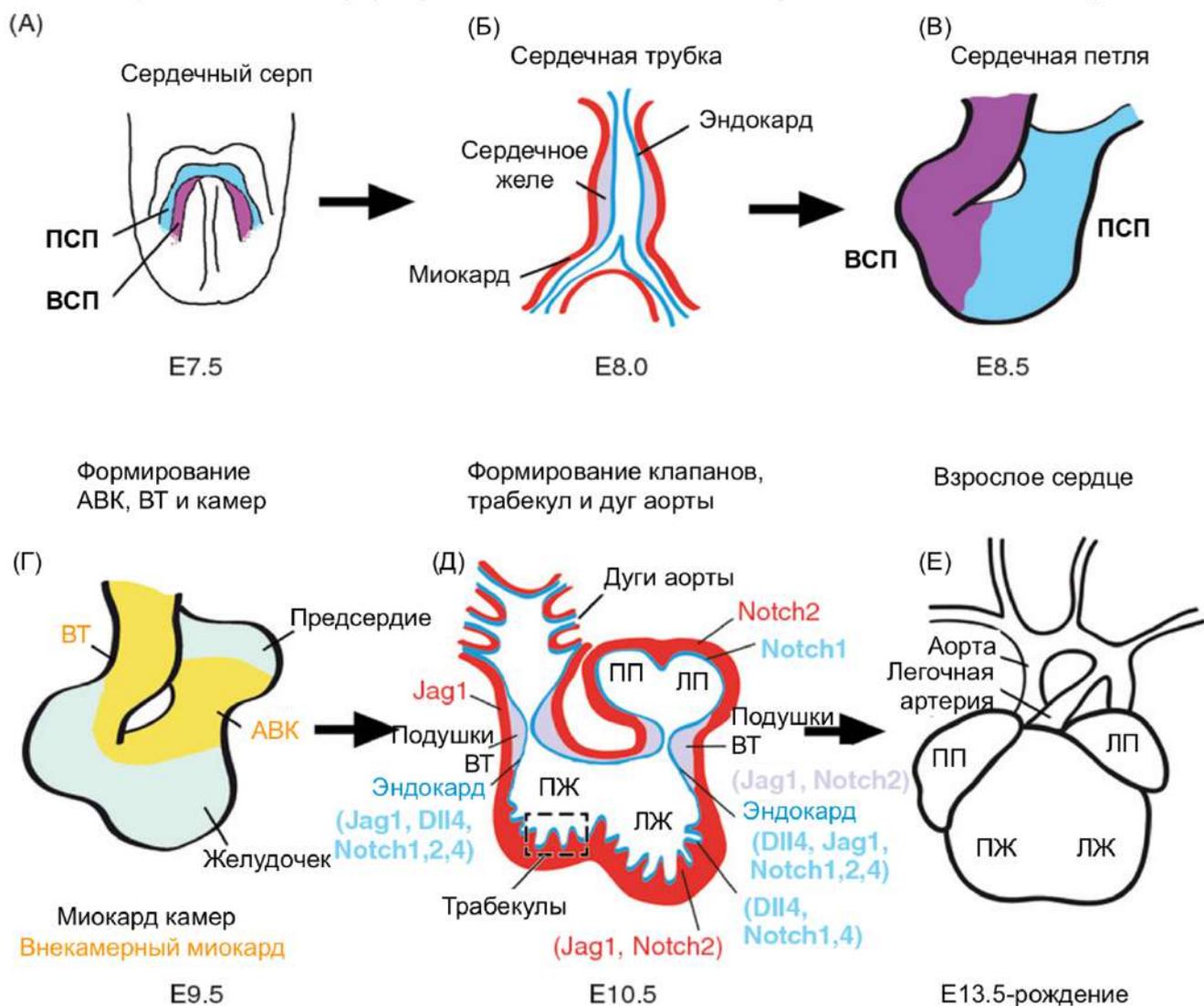


Рисунок 4. Стадии формирования сердца и экспрессия компонентов сигнального пути Notch в эмбриогенезе мыши. (А) На стадии E7.5 сердце мыши представлено сердечным полумесяцем, которое образовано за счёт двух популяций – первичного и вторичного сердечных полей, которые слились по срединной линии эмбриона. (Б) Во время E8.0 сердце трансформируется в эндотелиальную трубку (эндокард, *синий*), окруженную слоем миокардиальных клеток (*красный*). Между эндокардом и миокардом находится внеклеточный матрикс — сердечное желе (*серый*). (В) На E8.5 сердце удлиняется и начинает закручиваться вправо, образуя сложную структуру с четырьмя камерами. (Г) Формирование атриовентрикулярного канала происходит на стадии E9.5 и имеет решающее значение для разделения двух камер, развивающихся предсердий и желудочков. (Д) Формирование зачатков клапана происходит между E9.5 и E10.5 вместе с развитием камеры желудочка, которое начинается с формирования трабекул в развивающихся левом и правом желудочках. Тканевая экспрессия лигандов и рецепторов Notch имеет цветовую кодировку: эндокард — синий; миокард - красный, эндокардиальные подушки - серый. (Е) Сердечный выносящий тракт ремоделируется между стадиями E10.5 до E13.5 с образованием аорты и легочных артерий. Стадии развития указаны в эмбриональных днях. На всех панелях сердце просматривается с вентральной стороны, а с передней — вверх [56].

Поддержание баланса между пролиферацией и дифференцировкой кардиомиоцитов имеет решающее значение при формировании камер желудочков в развитии сердца, а также в

гомеостазе сердечной функции в постнатальном периоде. В ходе эмбриогенеза сердца данный этап развития протекает во время завершения процесса перекручивания сердечной трубки, при котором возникают трабекулы как высокоорганизованные пласты кардиомиоцитов. Впоследствии они образуют мускульные гребешки, выстланные эндокардиальными клетками, в результате взаимодействия примитивного миокарда и эндокарда. Образование этих структур является ранним характерным признаком дифференцировки желудочков. Постепенно трабекулы дают начало части папиллярных мышц, межжелудочковой перегородки и проводящей системы сердца. В данных процессах непосредственно задействован сигнальный путь Notch, который играет решающее значение при образовании желудочковых трабекул и развития камер. Например, EphrinB2 служит прямой мишенью Notch в эндокарде, как и активность BMP10 и Нейрегулина-1 (NRG1) также зависят от Notch, последние способствуют пролиферации и дифференцировке миокарда желудочков [57, 58].

Развитие сердца сопряжено с процессами формирования кровеносных сосудов, образующимися из популяций ангиобластов – мезодермальных предшественников эндотелиальных клеток. Они первыми дифференцируются и образуют примитивные кровеносные сосуды или первичное сосудистое сплетение [59]. После васкулогенеза начинаются процессы ангиогенеза, в которых также принимают участие заложенные генетические механизмы. Известно, что в ходе эмбрионального развития ещё до появления кровотока, эндотелиальные клетки приобретают свои специфические маркеры и идут по детерминированному пути. Непосредственное участие в этом процессе принимает сигнальный путь Notch. Например, в мышечных эндотелиальных клетках экспрессируются рецепторы *Notch1-2,4*. Если же экспрессия рецепторов *Notch1* и *Notch2* является конститутивной и необходимой для нормального развития, то инактивация *Notch4* не сказывается на развитии сосудов. К тому же, если наблюдается гиперэкспрессия *Notch4*, то это приводит к функциональным нарушениям [60]. Помимо рецепторов в эндотелиальных клетках экспрессируются специфические лиганды Notch, такие как *Dll4* и *Jagged1*. Последний, например, экспрессируется в эндотелии у мышей и при его подавлении происходят необратимые изменения в виде появления дефектов в ангиогенезе, хотя это нарушение не затрагивает крупные сосуды [61].

В исследованиях, связанных с выяснением роли Notch в артериовенозной дифференцировке во время формирования эмбриональных кровеносных сосудов у рыб *Danio Rerio* установили, что экспрессия *NOTCH3* происходит только в эндотелиоцитах дорзальной аорты, и не затрагивается в клетках задней кардиальной вены [62]. Это специфичное функционирование связано со сдерживанием эндотелиальных клеток от перехода в венозную дифференцировку. У эмбрионов с дезактивированным сигнальным путём Notch в клетках не происходила экспрессия

трансмембранного белка *ephrinB2*, специфичного для клеток с артериальной дифференцировкой, а начиналась экспрессия венозных маркеров в пределах дорзальной аорты. К тому же нарушение передачи сигналов Notch в эмбриогенезе сосудистой системы вызывало многочисленные морфологические дефекты, например, ремоделирование крупных магистральных сосудов. Таким образом, сигнальный путь Notch оказывает сильное влияние на артериовенозную дифференциацию кровеносных сосудов.

1.4 Пороки развития сердца

Тетрада Фалло (ТФ) — это выраженный цианотичный врожденный порок сердца (ВПС), характеризующийся сублёгочным стенозом и преобладающим сбросом крови справа налево через дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП), что приводит к циркуляции дезоксигенированной крови по системным артериям. Современные способы хирургии позволяют скорректировать обструкцию оттока из правого желудочка и закрывать дефект межжелудочковой перегородки, обеспечивая эффективное кровообращение через левый желудочек кровью, насыщенной кислородом [63]. У пациентов с тетрадой Фалло часто наблюдаются разнообразные сердечные аномалии, такие как гипертрофия и дегенерация кардиомиоцитов, а также различные типы фиброзов разной степени выраженности. Предполагается, что эти состояния являются следствием повышенного давления в правом желудочке и гипоксии [64].

Точные причины развития тетрады Фалло до сих пор остаются недостаточно изученными, и окончательные гены-кандидаты, непосредственно связанные с формированием заболевания, не были выявлены. Около 20% случаев ТФ связаны со специфическими синдромами или хромосомными аномалиями [65], при этом у 15% пациентов с ТФ наблюдается делеция хромосомы 22q11.2, в первую очередь связанная с изменениями гена *TBX1* [66]. Большинство случаев ТФ, примерно 80%, не являются синдромальными и не имеют четкого менделевского типа наследования [67]. Это привело к предположению о полигенной основе ТФ, что побудило провести полногеномные исследования для выяснения генетических факторов, способствующих развитию ТФ и других ВПС [63].

Секвенирование всего экзона выявило новые гены-кандидаты для развития ВПС, что отражает сложную природу формирования сердца, ввиду того, что несколько транскрипционных факторов и сигнальных молекул, имеющих решающее значение для формирования сердца, таких как *GATA4*, *NKX2.5*, *FOXC2*, *TBX5* и *TBX1*, участвуют в патогенезе ТФ [68]. Предполагается, что дисбаланс во взаимодействиях этих важных для кардиогенеза факторов транскрипции имеет решающее значение в возникновении несиндромального ТФ.

Изменения в генах *NOTCH1*, *NOTCH2* и *JAG1*, являющихся частью сигнального пути Notch, связаны с ТФ, хотя мутации в этих генах чаще связаны с другими врожденными пороками сердца [69, 70]. Данные исследования подтверждают важную роль генов Notch в развитии тетрады Фалло. Например, у пациентов с этим состоянием были выявлены вариации числа копий генов *NOTCH1* и *JAG1* [71]. Кроме того, анализ тканей правого желудочка у этих пациентов выявил существенное снижение активности генов, связанных с путями Wnt и Notch [72]. Проведенные полноэкзомные исследования также показали [73, 74], что локус гена *NOTCH1* представляет повышенный интерес в контексте несиндромальной тетрады Фалло: у 7% пациентов были обнаружены редкие вредные варианты, которые могут предрасполагать к развитию данного заболевания. Следовательно, сигнальный путь Notch является неотъемлемой частью развития сердца, а его нарушение регуляции может способствовать патогенезу врожденных пороков сердца.

1.5 Гомеостаз и регенерация сердца

Способность сердца к регенерации является предметом активных дискуссий и споров в научном сообществе [75, 76]. Исследования Павла Павловича Румянцева на моделях лягушек и мышей, впервые показали наличие гиперплазии клеток сердца, которые были описаны в его монографии [77]. Эти результаты положили начало более широкому изучению возможных регенеративных механизмов сердца млекопитающих, в том числе, человека. Современный консенсус предполагает, что человеческое сердце обладает ограниченной способностью к регенерации. Исследования показывают, что образование новых кардиомиоцитов происходит у взрослых, хотя и с умеренной скоростью, около 0,5–1% в год, согласно различным оценкам [78, 79]. Однако более выраженная регенеративная активность была отмечена у мышей в натальный период жизни, сердце которых обладало значительной способностью к регенерации [80, 81]. Это подтверждается активной пролиферацией кардиомиоцитов в течение первой недели жизни после травмы [29].

Впоследствии регенеративные процессы у мышей смещаются к типичным для взрослых закономерностям заживления ран, что приводит к образованию фиброзной ткани в местах повреждений [82]. Замечательный случай функциональной регенерации сердца был зарегистрирован у младенца, у которого произошло восстановление миокарда после тяжелой ишемии, вызванной окклюзией коронарной артерии, что позволяет предположить наличие определенного регенеративного механизма [83].

Текущие исследования в первую очередь сосредоточены на скорости обновления кардиомиоцитов как в здоровых, так и в поврежденных сердцах взрослых животных. Например, исследования показали различные уровни активности клеточного цикла желудочковых кардиомиоцитов у взрослых крыс в диапазоне от 0 до 3,15% [84]. Эти различия могут быть связаны с различными методологиями, используемыми для оценки активности клеточного цикла, такими как включение меченного бромдезоксипуридина тимидина или трития, что указывает на более высокие скорости обновления из-за расширенных S-фаз. Напротив, цитологические методы могут демонстрировать более низкую скорость пролиферации.

Точная идентификация кардиомиоцитов и их ядер была методологической проблемой. Традиционное использование конфокальной микроскопии и иммунофлуоресценции для выявления цитоплазматических маркеров, таких как тропонин Т, считалось точным для идентификации ядер кардиомиоцитов в срезах тканей [85]. Однако ограниченное разрешение конфокальной микроскопии вдоль оси Z, особенно для клеток размером менее 0,5 микрометра, влияло на точную идентификацию ядер конкретных клеток. Современные методы, такие как сортировка клеток, активируемая флуоресценцией (FACS), теперь позволяют разделять одноядерные и двуядерные кардиомиоциты [86], что является значительным достижением, учитывая, что кардиомиоциты составляют около 30% от общего числа клеток сердца, как показывают технологии секвенирования единичных клеток и другие методы [87].

Терапия стволовыми клетками и связанными с ними клеточными продуктами становится многообещающим подходом для профилактики и лечения сердечной недостаточности [88-90]. Достижения в этой области могут изменить методы восстановления сердечной мышцы. Растет интерес к резидентным стволовым клеткам в тканях взрослого человека, в том числе к тем, которые обнаруживаются в костном мозге, жировой ткани и мышцах, которые, как известно, содержат популяции стволовых клеток [91, 92]. Определение того, обладает ли сердце собственным регенеративным потенциалом для восстановления миокарда, остается ключевым вопросом в регенеративной медицине сердца.

1.6 Мезенхимные клетки сердца

1.6.1 Открытие стволовых клеток сердца

Миокард взрослого человека представляет собой сложную структуру, состоящую из разнообразных клеток, среди которых не только кардиомиоциты. Преобладающими являются эндотелиальные клетки, формирующие сеть коронарных и лимфатических сосудов, а также

выстилающие эндокард. Кроме того, в миокарде находятся фибробласты, перициты, элементы нервной системы и иммунные клетки [93].

Переориентация исследователей на изучение стволовых клеток сердца (СКС), обнаруженных около двадцати лет назад [94], стала значимым шагом в развитии клеточной терапии «второго поколения». Открытие СКС побудило научное сообщество к пересмотру стратегии проведения клинических испытаний, сместив акцент с использования экзогенных стволовых клеток на применение резидентных клеток самого органа. Стволовые клетки сердца взрослого были выявлены и выделены по аналогичным критериям, применяемым для гемопоэтических стволовых клеток, включая наличие на поверхности белков c-Kit и Sca-1, но отсутствие маркеров гемопоэтических линий. Тем не менее, способность этих клеток к дифференцировке в кардиомиоциты остается предметом дискуссий, хотя их потенциал к пролиферации и превращению в эндотелиальные клетки не вызывает сомнений [95].

Исследования лаборатории Пьера Анверзы, которая сделала важное открытие в области изучения СКС, были подвергнуты ревизии из-за сомнений в достоверности их данных. В 2003 году они опубликовали статью, в которой описали клетки c-Kit⁺ СКС, имеющие рецептор тирозинкиназы c-Kit и не экспрессирующие маркеры гемопоэза [14]. Затем в последующих своих трудах они описали свойства СКС, такие как способность к образованию клонов и самообновлению, а также наличие мультипотентности [96].

В сердце человека присутствуют разнообразные клеточные популяции, предположительно, обладающие стволовым потенциалом [97]. Однако их доля в сердце очень мала - от 0,005 до 2,0% от всех клеток, что затрудняет их изучение на живых организмах. Было установлено, что трансплантация этих клеток положительно влияет на восстановление сердца благодаря их паракринному и ангиогенному действию, а не способностью к делению и дифференциации СКС в кардиомиоциты [98]. Тем не менее, благодаря открытию данных клеток появились новые направления исследований, связанные с внеклеточными везикулами, которые выделяют СКС, например, экзосомы, и участвуют в формировании секретора в сердце [28]. Формулируется предположение, что можно усилить естественные механизмы восстановления сердца, активируя внутренний регенеративный потенциал или применяя экзогенную клеточную терапию [99].

В миокарде встречаются разнообразные популяции мезенхимных клеток сердца, которые были описаны и классифицированы [100]. Они обладают высокой пролиферативной активностью и способностью проявлять различные фенотипы в зависимости от условий культивирования (**Рисунок 5**).

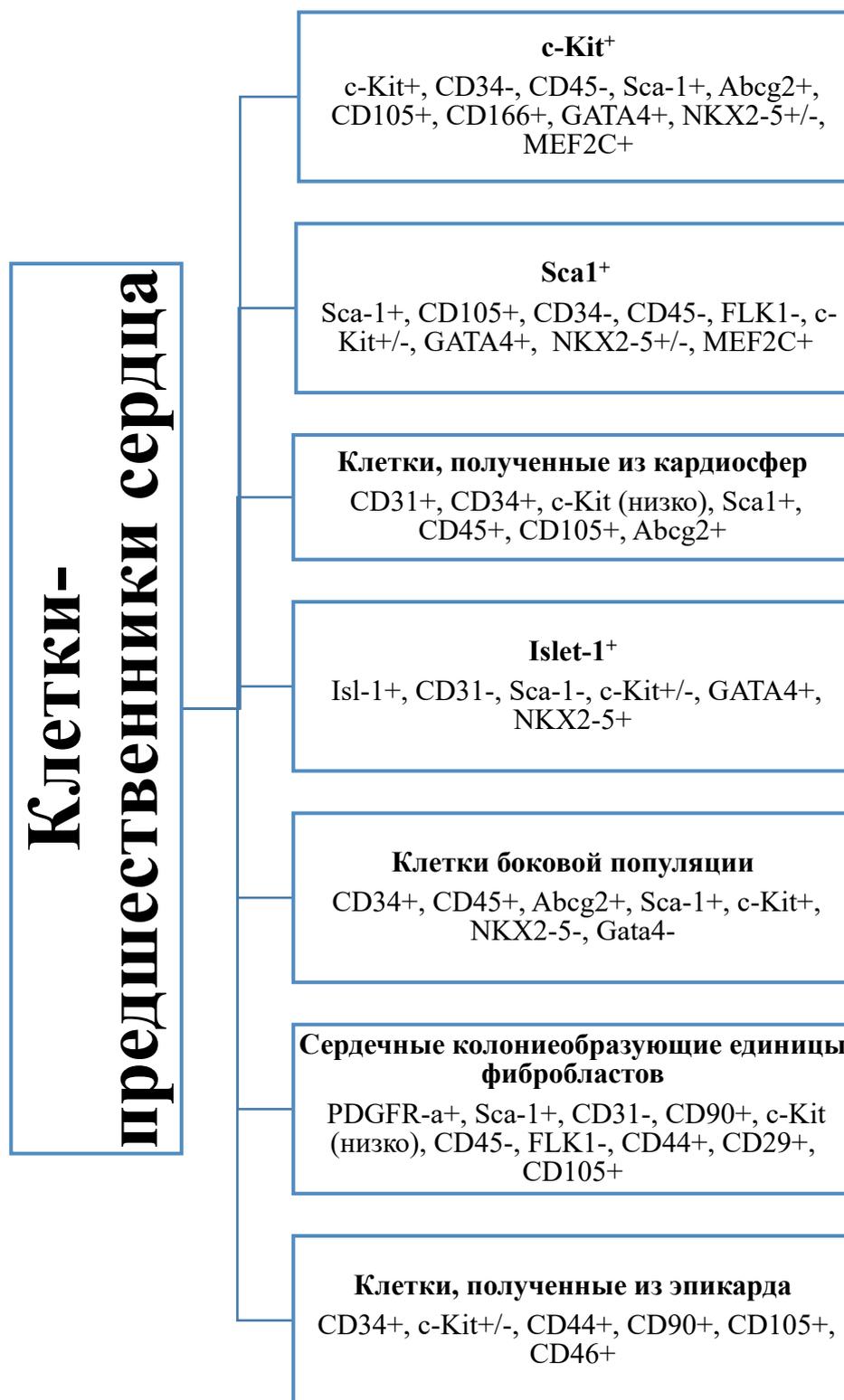


Рисунок 5. Общая характеристика фенотипов резидентных клеток-предшественников сердца [100].

1.6.2 Популяция клеток c-Kit⁺

Наличие экспрессии c-Kit, обнаруженная в клетках сердца, стало причиной для рассмотрения данной популяции клеток как клеток-предшественников сердца. Однако позже было установлено, что такая экспрессия присутствовала также в кардиомиоцитах новорожденных, зрелых недифференцированных кардиомиоцитах, и в клетках эпикарда и эндотелии коронарных артерий [101]. В одном из исследований на взрослых мышцах было показано [102], что наличие гетерозиготной мутации c-Kit^{W/W^v} способствовало усилению процессов регенерации сердца после сердечной нагрузки в виде повторного вхождения взрослых кардиомиоцитов в клеточный цикл и активацией в них пролиферации. Без наличия мутации у мышей «дикого типа» происходила лишь гипертрофия кардиомиоцитов. Это подтверждает важность экспрессии c-Kit для регуляции клеточного состояния, особенно в терминальной дифференциации, что делает c-Kit не маркером определенного клеточного типа, а маркером состояния клеток [28].

Гетерогенная популяция клеток c-Kit⁺ в сердце взрослого организма и их происхождение плохо изучено, но имеются экспериментальные данные [101], свидетельствующие о связи между эмбриональными и взрослыми популяциями. Эмбриональные стволовые клетки мышей после дифференцировки *in vitro* давали незрелые мезодермальные клетки, экспрессирующие c-Kit и сердечный транскрипционный фактор Nkx2-5, которые могли дифференцироваться в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки. Но взрослые клетки c-Kit⁺ не имели таких возможностей и не могли дифференцироваться в кардиомиоциты, даже при трансплантации в здоровое или ишемизированное сердце [28]. По данным исследований [14, 103], клетки c-Kit⁺, обладающие некоторым потенциалом к дифференцировке в кардиомиоциты, в сердце взрослого человека очень редки, и их селекция способствует увеличению популяции самообновляющихся клеток с мультипотентными свойствами.

c-Kit⁺ клетки демонстрировали способности к миогенезу и ангиогенезу при трансплантации в нескольких доклинических исследованиях [104-106]. Это стало поводом для проведения клинических испытаний, которые подтвердили безопасность и предварительную клиническую эффективность. Результаты второй фазы многоцентрового исследования CONCERT-HF (NCT02501811), в котором участвовали 125 пациентов и которое было посвящено использованию мезенхимных клеток и клеток c-Kit⁺ как нового типа возможной регенеративной терапии сердечной недостаточности, показали улучшение клинических показателей пациентов. Эти результаты также подтверждают потенциал такого лечения для будущего [107].

1.6.3 Колониеобразующие единицы фибробластов сердца

В 2011 году была обнаружена популяция клеток в сердце взрослого организма, напоминающих по своим свойствам мезенхимные стволовые клетки. Они экспрессировали рецептор тромбоцитарного фактора роста альфа (*PDGFR α*) и *Sca-1*, и обладали свойствами стволовых клеток, в том числе активной способностью к образованию клеточных клонов [108]. Данные клетки были названы как колониеобразующие единицы фибробластов сердца (сКОЕ-Ф), имеющие некоторые сходства с колониеобразующими единицами фибробластов из костного мозга.

PDGFR α играет важную роль в кардиогенезе, проявляясь в ранней мезодерме, в том числе в кардиальной мезенхиме. Нокаут гена *PDGFR α* приводил к нарушениям в развитии выносящего тракта, коронарных артерий, перегородки и камер сердца у эмбрионов мышей, что подтверждало значимость *PDGFR α* для раннего кардиогенеза [101]. Экспрессия *PDGFR α* была особенно сильной в проэпикарде и эпикарде, а также в фибробластах, происходящих из эпикарда претерпевавших эпителиально-мезенхимный переход [108]. У мышей с нокаутом *PDGFR α* в эпикарде нарушался эпителиально-мезенхимный переход и уменьшалось количество сердечных стромальных фибробластов. Но это не влияло на развитие гладкомышечных клеток, также производных от эпикарда. Роль сигнализации *PDGFR α* в сКОЕ-Ф не до конца понятна, хотя известно, что *PDGFR α* нужен для эпителиально-мезенхимного перехода и образования стромальных фибробластов во время развития, что может свидетельствовать о его важности для поддержания стволового фенотипа [109].

В сердцах взрослых мышей и человека были идентифицированы эпикардиальные стволовые клетки, экспрессирующие *PDGFR α* , и занимающие интерстициальное и периваскулярное пространство. Некоторые из них соответствовали сКОЕ-Ф, такие как *PDGFR α ⁺/SCA1⁺/PECAM1⁻ (CD31)*, которые давали клональные колонии мезенхимных клеток *in vitro*. Они имели маркеры CD29, CD44, CD90 и CD105, свойственные мезенхимным стволовым клеткам костного мозга [108]. К тому же экспрессия кардиоспецифичных маркеров *HAND1*, *MEF2C*, *GATA4* и *TBX5*, обнаруженная в популяциях стволовых клеток сердца и сКОЕ-Ф, также указывает на их принадлежность к резидентным клеткам сердца [110]. Возможность длительного культивирования сКОЕ-Ф демонстрирует их активную способность к самообновлению, а также к мультипотентности при совместном культивировании с эмбриональными стволовыми клетками для получения тератом и при трансплантации в ишемизированное сердце [110].

1.6.4 Популяция клеток *Isl-1*⁺

Ген *Isl-1* активно экспрессируется в мезодермальных предшественниках, находящихся в составе как в первичном, так и во вторичном сердечных полях. С развитием и дифференциацией этих клеток в различные сердечные линии при их миграции к области сердца, уровень экспрессии *Isl-1* значительно уменьшается [111]. Тем не менее, процесс формирования сердечной трубки может быть полностью нарушен в результате нокаута по гену *Isl-1* у клеток-предшественников, которые в таком случае теряют способность к росту, миграции и выживанию. Недавние исследования подтвердили, что клетки, экспрессирующие *Isl-1*, обладают потенциалом к дифференцировке в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки *in vitro* [112]. Отслеживание линии *Isl-1*⁺ клеток с эмбрионального периода показало их, хотя и небольшой, вклад в популяцию кардиомиоцитов в сердце новорожденных мышей.

В сердце взрослых мышей клетки с экспрессией *Isl-1* встречаются редко и в основном локализируются в синоатриальном узле, что порождает дискуссии относительно их роли как стволовых клеток в восстановлении сердца взрослого человека. Их редкость, наряду с наблюдениями, указывающими на ограниченную роль в регенеративных процессах после повреждения сердца, делает этот вопрос еще более неопределенным. Значимое присутствие *Isl-1*⁺ клеток не было замечено в зонах, прилегающих к поврежденным участкам сердечной ткани, хотя после ишемического реперфузионного повреждения было отмечено небольшое увеличение их численности.

Было показано [101], что эмбриональные стволовые клетки и клетки-предшественники мыши и человека, обладающие экспрессией *Isl-1*, способны к дифференцировке в кардиомиоциты, гладкомышечные и эндотелиальные клетки в лабораторных условиях. Такие эмбриональные клетки, которые экспрессируют *Isl-1*, использовались в клинических исследованиях. Например, клетки-предшественники *Isl-1*⁺/*CD15*⁺ были интегрированы в фибриновую матрицу для последующей трансплантации на эпикард пациентов, страдающих тяжелой дисфункцией левого желудочка. Это исследование было выполнено в рамках первой фазы испытаний ESCORT (NCT02057900), которая была завершена в 2018 году и показала как безопасность данной процедуры в кратко- и среднесрочной перспективе, так и техническую возможность её осуществления по получению клеток-предшественников из эмбриональных стволовых клеток человека для клинического применения [113].

1.6.5 Популяция клеток Sca-1⁺ и клеток, полученных из кардиосфер

Среди резидентных клеток-предшественников сердца выделяют также клетки Sca-1⁺ и клетки, полученные из кардиосфер (КПК), которые обладают способностью к образованию клонов. Однако их точное происхождение остаётся неизвестным. Клетки Sca-1⁺ в сердце составляют гетерогенную популяцию, включающую в себя клетки-предшественники c-Kit⁺, эндотелиальные клетки микрососудов, фибробласты сердца PDGFR α ⁺, стволовые клетки и другие клетки интерстициального и периваскулярного пространства. Отличительной чертой клеток Sca-1⁺ является экспрессия транскрипционных факторов, специфичных для сердца, таких как *TEF1*, *MEF2C* и *GATA4*, при отсутствии экспрессии *NKX2-5* [101]. Было показано, что сердечные фракции клеток Sca-1⁺ способны дифференцироваться в кардиомиоциты *in vitro* под воздействием 5-азацитина, а также улучшать функцию сердца при трансплантации мышам с инфарктом миокарда [114]. В экспериментах было обнаружено, что через две недели после трансплантации около 18% кардиомиоцитов в зоне инфаркта имели донорское происхождение, причем большая часть из них была сформирована в результате слияния донорских клеток с резидентными кардиомиоцитами [115].

Клетки, полученные из кардиосфер, представляют собой клетки с низкой адгезивной способностью, которые образуются в развивающемся сердце и формируют гетерогенные кластеры *in vitro*. Эти кластеры создают нишу для пролиферации сердечных клеток-предшественников c-Kit⁺ [116]. Происхождение КПК не до конца изучено, но они являются клетками сердца, не связанными с кардиомиоцитами [117]. КПК способны дифференцироваться в кардиомиоциты при сокультивировании с кардиомиоцитами новорожденных крыс [114]. Их трансплантация в миокард мышей, крыс или свиней, перенесших инфаркт, улучшает сердечную функцию [118]. В исследовании CADUCEUS, в котором пациентам с инфарктом миокарда вводили аутологичные КПК через коронарную артерию, спустя шесть месяцев не было обнаружено никаких побочных эффектов [119]. У пациентов, получавших КПК, наблюдалось снижение формирования рубцовой ткани, увеличение жизнеспособной сердечной ткани и улучшение функции сердца, что послужило стимулом для дальнейших клинических исследований [119]. Однако следующий этап испытаний ALLSTAR, завершённый в 2019 году, не подтвердил таких же положительных результатов, как первый этап, показав только безопасность введения аллогенных КПК пациентам с дисфункцией левого желудочка после инфаркта миокарда, но не обнаружив сокращения рубца по сравнению с плацебо за полгода [120].

1.7 Роль сигнального пути Notch в регуляции свойств мезенхимных клеток сердца

В настоящее время считается, что эпикард играет всё большую роль в гомеостазе и репарации миокарда, и может являться потенциальной нишей для популяций мезенхимных клеток сердца. При помощи электронных и иммунофлюоресцентных микроскопических исследований можно выявить около 10 различных типов клеток, включая МКС в эпикарде в постнатальный период. В одном из исследований группа учёных активировала регенеративные процессы в миокарде за счёт механизма контроля клеточного цикла мезенхимных клеток в микросреде эпикарда [121]. Jamie L. Russell с коллегами создали уникальную модель, обеспечивающую функциональную характеристику активации пути Notch при помощи трансгенного репортера Notch (TRN). Посредством TRN удалось идентифицировать и изолировать специфическую популяцию резидентных клеток, которые получили название Notch-активируемые эпикард-производные клетки (ЭПК). Анализ геномной экспрессии указал на их сродство с мультипотентными стромальными клетками, чем подтвердил их неоднородность, тем самым указав на их большой потенциал и тенденцию к дифференцировке. В других исследованиях была неоднократно доказана роль мезенхимных стволовых клеток в восстановлении сердца [122]. Таким образом, это ещё раз подтвердило то, что мультипотентные стромальные клетки являются некоторым пулом клеток, способных к репарации сердца. Тем не менее, ЭПК имели некоторые фенотипические отличия от общих МСК, такие как экспрессия маркеров эпикардиальной линии и локализация, непосредственно, в эпикарде, а также экспрессия и регуляция уровня транскриптома мышц. В одном исследовании удалось выявить реакцию ЭПК на травму в форме образования фиброза ткани. Как и большинство тканевых МСК, ЭПК также секретируют трофические факторы роста и дифференциации, такие как тимозин- β 4, PDGF- α , TGF- β 2,3; BMP-1,4; фактор роста гепатомы (HDGF), интерлейкины-18, 25; гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [121].

У некоторых видов позвоночных животных возможна полная регенерация поврежденного миокарда за счёт оставшихся КМЦ. Long Zhao с коллегами смогли установить, что регенерация сердца рыбки *Danio rerio* зависит от сигнального пути Notch [123]. Взрослые особи, в отличие от млекопитающих, сохраняют возможность восстанавливать своё сердце после повреждения за счёт распространения частично дедифференцированных КМЦ, не попавших в область травмы. Способность к пролиферации КМЦ можно встретить, также у мышей, но только в неонатальный период их развития. Причём уже на 7 день развития эмбриона начинается снижение эндогенного регенеративного потенциала, и КМЦ выходят из клеточного цикла под воздействием регуляции *meis1* [124]. Группе исследователей удалось выяснить локализацию активных пролиферирующих клеток, когда при ампутации верхушки желудочка *Danio* смогли

идентифицировать экспрессию трёх рецепторов Notch в эндокарде и эпикарде, но не в миокарде. Было уточнено то, что в регенеративном сигнальном пути принимают участие лиганды к TGF β и hedgehog. Дополнительно к этому было установлено, что при подавлении сигнального пути Notch ослабляется регенерация сердца и на месте ампутации индуцируется образование рубца, но тот же самый результат получается и при гиперактивации передачи сигналов Notch. Противоположный результат получается у мышей, когда при гиперактивации сигнального пути Notch в эпикарде клетки стремятся к принятию фибробластного фенотипа. Таким образом, активность сигнального пути Notch необходимо для поддержания регенерирующей способности у рыбок Данио, а также стимулирует пролиферацию незрелых КМЦ млекопитающих, и индуцирует остановку клеточного цикла у зрелых кардиомиоцитов [123].

Одной из причин остановки клеточного цикла зрелых КМЦ и превращение, в общей совокупности, сердца в постмитотический орган могут служить активные формы кислорода (АФК) митохондриального происхождения, как источник окислительного стресса у постнатальных кардиомиоцитов [22]. Исходя из того, что внутриутробный период млекопитающих протекает в условиях гипоксии, то возможности для регенерации сердца остаются активными, а в постнатальном периоде происходит задержка клеточного цикла КМЦ, посредством окислительного повреждения ДНК, вызванного за счёт индукции митохондриальных АФК. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что системная гипоксия может подавить аэробное дыхание и уменьшить окислительное повреждение ДНК, вызвав в ответ пролиферацию КМЦ у взрослых млекопитающих. Yuji Nakada и его коллеги применили воздействие тяжелой системной гипоксемии у взрослых мышей, что привело к ингибированию окислительного метаболизма, снижению АФК и окислительного повреждения ДНК и к запуску реактивации митоза КМЦ. После индукции инфаркта миокарда и воздействия гипоксемии *in vivo* в течение 1 недели привело к активации регенеративных процессов в сердце мышей с уменьшением фиброза, а также к улучшению систолической функции левого желудочка [22]. Важно отметить, что воздействие хронической тяжелой гипоксемии, индуцированной постепенным снижением вдыхаемого кислорода, способствовало к активации повторного клеточного цикла зрелых КМЦ, что в следствии привело к значительному функциональному восстановлению после инфаркта миокарда. Таким образом, было установлено, что эндогенные регенеративные свойства сердца млекопитающих в постнатальный период могут быть активированы путем воздействия системной гипоксемии, так как экзогенный кислород вызывает митохондриально-зависимое окислительное повреждение ДНК, которое участвует в регуляции клеточного цикла КМЦ новорожденных и взрослых млекопитающих.

1.8 Взаимодействие BMP2 и сигнального пути Notch в контексте эндотелиально-мезенхимного перехода

Эндотелиально-мезенхимный переход (эндоМП) является одним из ключевых событий, происходящих в сердце как при развитии органа, так и при патологии. В ходе этого процесса эндотелиальные клетки претерпевают ряд изменений, в том числе утрату плотных межклеточных контактов, усиление миграционной активности и секреции белков внеклеточного матрикса, в результате чего они приобретают фенотип клеток «мезенхимной природы» [125]. Например, при нормальном физиологическом развитии такая трансформация клеток необходима для правильного формирования сердечных клапанов в развивающемся сердце [126]. Напротив, реактивация процессов эндоМП характерна и для развития ряда сердечно-сосудистых патологий, таких как атеросклероз и фиброз миокарда [127, 128].

Сердечный фиброз формируется в результате развития сердечной недостаточности, например, в результате инфаркта миокарда, и характеризуется избыточным отложением коллагена, что вызывает ремоделирование органа [129, 130]. Многие сигнальные пути участвуют в эндоМП и активно модулируют процесс, и наиболее важным является сигнальный путь Notch, который является ключевым регулятором эндоМП при миокардиальном фиброзе, стимулируя экспрессию транскрипционных факторов *Snai*, *Slug* и *Zeb1* [128, 131, 132]. Ранее нами было отмечено, что фактор BMP2 из суперсемейства TGF- β участвует в процессах раннего ремоделирования миокарда в мезенхимных клетках сердца (МКС) [23]. Активация фактора BMP2 в МКС сопровождалась повышением экспрессии компонентов сигнального пути Notch, что свидетельствовало о реактивации эмбриональных сигнальных путей при фиброзе миокарда. Сигнальный каскад, индуцируемый TGF- β , является наиболее важным регуляторным путем в инициации и развитии эндоМП [133]. Остается неясным, взаимодействуют ли пути передачи сигналов Notch и BMP2 друг с другом в процессах эндоМП.

Таким образом, сигнальный путь Notch может являться ключевым механизмом, отвечающим на гипоксию, и участвовать в процессах активации МКС и раннего ремоделирования миокарда. Ввиду этого изучение связи между гипоксией и сигнальным путём Notch является крайне важным для поиска молекулярных мишеней, вовлечённых в патогенез заболеваний.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на базе НИЛ молекулярной кардиологии и генетики НИИ молекулярной биологии и генетики НМИЦ им. В. А. Алмазова (Санкт-Петербург, Россия). Хирургические операции над животными проводили в центре экспериментальной фармакологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (Санкт-Петербург, Россия).

2.1 Лабораторные животные

Протокол проведения исследований на животных был одобрен Комитетом по биоэтике Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (код протокола «Rats-MI-SC-2018», дата утверждения: 10.01.2018 год). В эксперименте использовали самцов крыс линии Вистар (Пушино, Россия) одного и того же возраста с массой тела от 200 до 250 г. Во время эксперимента животных содержали в отдельных пластиковых клетках со свободным доступом к еде и воде по стандартному рациону питания. Вся работа с животными проходила в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» [134].

2.2 Индукция инфаркта миокарда

Самцы крыс линии Вистар ($n=16$) были анестезированы хлоралгидратом (2 мг/кг, в/б), интубированы и подключены к вентилятору легких (SAR-830P; CWE, Inc., Ардмор, Пенсильвания), который подавал комнатный воздух с дыхательным объемом 2 мл/100 г и частотой дыхания 60 вдохов в минуту. Температуру тела поддерживали на уровне $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью грелки с терморегулятором (контроллер TCAT-2LV; Physitemp Instruments Inc., Клифтон, Нью-Джерси). Электрокардиография позволяла контролировать частоту сердечных сокращений и аритмии. После торакотомии через четвертое межреберье сердце было визуализировано. Затем перикард удалялся тупым способом с помощью анатомических пинцетов. На границе ушка левого предсердия была обнаружена левая коронарная артерия, под которую была подведена лигатура (пролен 6/0, Ethicon, Германия) у края ушка [135]. Ишемия миокарда определялась по визуальным изменениям передней стенки сердца и подъему сегмента ST на ЭКГ.

2.3 Пациенты

Протокол проведения работы с человеческим материалом был одобрен этическим комитетом НМИЦ им. В. А. Алмазова (этическое разрешение от 26.12.2014), и соответствовал принципам Хельсинской декларации (с правками от 2013 года) [136]. От каждого пациента (его представителя) было получено информированное согласие.

Образцы тканей миокарда были собраны во время хирургического вмешательства, проводимого в клинике НМИЦ им. В. А. Алмазова. Были собраны фрагменты правого желудочка ($n = 42$) и правого предсердия ($n = 14$) при коррекции тетрады Фалло и дефекта межжелудочковой перегородки, соответственно. Возраст пациентов на момент операции составлял, в среднем, 120–150 дней от рождения. Выраженный цианоз (сатурация $\leq 85\%$) был характерен только для 14 (33%) пациентов с синдромом тетрады Фалло.

2.4 Клеточные культуры

В работе использовались первичные культуры клеток, а именно:

- Мезенхимные клетки сердца крыс (МКСк);
- Мезенхимные клетки сердца человека (МКСч);
- Эндотелиальные клетки пуповинной вены человека (ПВЭК).

Также в работе применялась постоянная клеточная линия:

- Клетки линии первичной почки человека 293-Т.

2.4.1 Мезенхимные клетки сердца крыс

2.4.1.1 Выделение мезенхимных клеток сердца крыс из ткани миокарда

Индукция инфаркта миокарда проводилась с помощью перманентного лигирования левой коронарной артерии, в результате чего происходило поражение части миокарда в левом желудочке сердца. Через 8 и 24 часов производился забор материала. МКСк получали из постинфарктной зоны (включая периинфарктную область) миокарда, которая визуалью немного отделялась за счёт белесоватого оттенка, и находилась под лигатурой. Постинфарктные ткани измельчались механическим способом и расщеплялись с помощью ферментативной обработки раствором коллагеназы 2 типа (2 мг/мл, Worthington) в течение 90 минут в инкубаторе (37°C, 5%

CO₂, влажность 99%); в качестве негативного контроля использовался здоровый миокард крыс, которым предварительно была проведена ложная операция.

Клетки центрифугировали 5 минут при 300 g, ресуспендировали в среде (дважды), высевали на флакон с фильтром и инкубировали при 37°C, 5% CO₂, 99% влажность. Среда для МКСк состояла из: 70% DMEM/F₁₂ (Invitrogen, США), 20% эндотелиальной среды клеточного роста (Cell Applications Inc., США), 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 100 мкМ MEM NEAA (Gibco, США), смеси пенициллина и стрептомицина (10 000 ед/мл) (Gibco, США), и 2 мМ L-глутамин (Gibco, США). Среда меняли на свежую каждый день в течение трех дней. На третий день удаляли остатки ткани и культивировали до формирования монослоя (~1 неделя). В культуре не было живых кардиомиоцитов, а клетки были однородны. В исследовании использовали мезенхимные клетки сердца крыс 2–3 пассажей, выделенные из миокарда через 8 и 24 часа после хирургического вмешательства.

2.4.1.2 Иммунофенотипирование мезенхимных клеток сердца крыс

Фенотип МКСк определяли с помощью проточной цитофлуориметрии на CytoFlex (Beckman Coulter, США). Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (100 мкл) с 1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), инкубировали 30 минут в темноте при комнатной температуре с антителами по инструкции производителя. Панель из антител была следующей: CD31 (CD31 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated, cat. #bs-0468R-FITC, Bioss Antibodies, США), CD34 (CD34 Polyclonal Antibody, FITC Conjugated, cat. # bs-0646R-FITC, Bioss Antibodies, США), CD45 (PE Mouse Anti-Rat CD45, cat. #554878, BD Pharmingen™, США), CD90 (PE Mouse Anti-Rat CD90/Mouse CD90.1, cat. #551401, BD Pharmingen™, США), CD166 (CD166 Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR® 488 Conjugated, cat. #bs-1251R-A488, Bioss Antibodies, США). В качестве контроля использовались неокрашенные клетки, а также изотипы: Rabbit IgG Isotype Control, PE Conjugated (cat. #bs-0295P-PE, Bioss Antibodies, США), Rabbit IgG Isotype Control, FITC Conjugated (cat. #bs-0295P-FITC, Bioss Antibodies, США). Дебрис исключали по порогу FSC. Флюоресценцию анализировали по одно- и двухпараметровым графикам. Каждый образец содержал не менее 10 000 событий. Данные обрабатывали в CytExpert 2.1 (Beckman Coulter, США).

2.4.2 Мезенхимные клетки сердца человека

2.4.2.1 Получение мезенхимных клеток сердца человека

МКСч получали из миокарда, взятого после операций по коррекции тетрады Фалло или дефекта межжелудочковой перегородки в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. Ткань миокарда промывали в ФСБ, измельчали и инкубировали с коллагеназой-2 (2 мг/мл) 100 минут при 37°C [137]. Суспензию центрифугировали дважды по 5 минут при 300g и ресуспендировали в среде (70% DMEM/F₁₂ (Invitrogen, США), 20% эндотелиальной среды клеточного роста (Cell Applications Inc., США), 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), 100 мкМ MEM NEAA (Gibco, США), смеси пенициллина и стрептомицина (10 000 ед/мл) (Gibco, США), и 2 mM L-глутамин (Gibco, США)) и высевали на флакон. Среду меняли ежедневно в течение 3 дней. После достижения конфлюэнтного состояния клетки пересевали. В экспериментах использовали МКСч 2–3 пассажей.

2.4.2.2 Иммунофенотипирование мезенхимных клеток сердца человека

Иммунофенотипирование МКСч осуществлялось методом проточной цитометрии с использованием аппарата CytoFlex от компании Beckman Coulter, США. Для этого клетки суспендировали в объеме 100 мкл ФСБ с добавлением 1% фетальной бычьей сыворотки от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США) и инкубировали с набором специфических антител в течение 20 минут при комнатной температуре в условиях отсутствия света. Использовалась такая панель антител: PE-меченные анти-CD31 (Beckman Coulter, США, IM2409), APC-меченные анти-CD34 (Beckman Coulter, США, IM2472U), PE-меченные анти-CD90 (Beckman Coulter, США, IM1840U), PE-меченные CD146 (Beckman Coulter, США, A07483) и CD166 (Beckman Coulter, США, A22361), а также APC-меченные анти-PDGFR- β (BD Pharmingen, США, FAB1263A). В качестве контроля использовали клетки без окрашивания. Для отсеивания дэбриса были установлены пороги по прямому (FSC) и боковому (SSC) рассеяниям света, с настройками на логарифмической шкале усиления. В ходе анализа было рассмотрено 10 тысяч событий. Обработка и анализ полученных данных выполнялись в программе Kaluza 2.0 от компании Beckman Coulter.

2.4.3 Дифференцировка мезенхимных клеток сердца в кардиогенном, адипогенном и остеогенном направлениях

Мезенхимные клетки сердца (МКС) дифференцировали в трёх направлениях: кардиогенном, остеогенном и адипогенном. Клетки были посеяны в концентрации 10^4 клеток на квадратный сантиметр на лунки с использованием 12-луночных планшетов. Спустя день после посева меняли культуральную среду на специализированную для дифференцировки, включающую 97% среды DMEM/F₁₂ (Invitrogen, США), 2% лошадиной сыворотки (Invitrogen, США), аминокислотного раствора MEM-NEAA (Gibco, США) в концентрации 100 мкМ, 1% смеси инсулин-трансферрин-селен (Invitrogen, США), и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Gibco, США) в дозировке 10000 единиц/мл.

Для кардиогенной дифференцировки использовали 5 мкМ 5-азациитидина (Sigma-Aldrich, США), который добавляли в среду через сутки после посева и обновляли ежедневно в течение трех дней [138]. На шестой день в среду вносили аскорбиновую кислоту (10^{-4} М) (Sigma-Aldrich, США) и TGF- β 1 (1 нг/мл) (Peprotech, США), которые далее добавляли каждые два дня (аскорбиновую кислоту), а TGF- β 1 два раза в неделю соответственно, с обновлением среды каждые 2–3 дня в течение 24 дней [139]. Фенотип клеток, подобным кардиомиоцитам, подтверждали иммуноцитохимическим окрашиванием антителами к α -актину и анализировали на флуоресцентном микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

Остеогенная дифференцировка начиналась на следующий день после посева с заменой среды на дифференцировочную, содержащую аскорбиновую кислоту (50 мкМ), дексаметазон (1 мкМ), и бета-глицерофосфат (10 мМ) от Sigma, США, с двукратным еженедельным обновлением среды на протяжении 21 дня. Качественный анализ дифференцировки проводился с использованием субстрата NBT/BCIP (Roche, Швейцария) для выявления щелочной фосфатазы. Для этого забирали культуральную среду, промывали раствором ФСБ два раза и инкубировали с NBT/BCIP в течение 10 мин до появления окраски. Результаты фиксировали с помощью микроскопа AxioObserver.D1 (Carl Zeiss, Германия).

Адипогенная дифференцировка осуществлялась в среде с добавлением 3-изобутил-1-метилксантина (0.5 мМ), дексаметазона (1 мкМ), инсулина (1 мкМ), индометацина (0.2 мМ) и росиглитазона (0.5 мМ) от Sigma, США, при двукратной еженедельной замене среды на протяжении 14 дней. Дифференцированные клетки окрашивались красителем OilRed (Sigma, США). Для этого забирали культуральную среду и промывали раствором ФСБ. Далее фиксировали клеточный монослой 4% раствором параформальдегидом (ПФА) в течение 30 минут при комнатной температуре с последующей отмывкой ФСБ. После чего, добавляли краситель OilRed и инкубировали в течение 30 мин. Клетки промывали дважды водой и оставляли

небольшое количество воды для предотвращения пересыхания клеток. Анализ результатов окрашивания производили с помощью инвертированного микроскопа Axiovert (Zeiss, Германия).

2.4.4 Анализ пролиферативной активности мезенхимных клеток сердца

Скорость пролиферации МКС оценивали двумя способами – в ручном и автоматическом режимах. В первом случае мы использовали метод построения кривых роста. Клетки рассеивали при плотности 10^3 клеток на см^2 . Каждые 2 суток производили подсчёт клеток в камере Горяева.

Вторым способом была регистрация скорости пролиферации в режиме реального времени с использованием системы xCELLigence RTCA DP. Мы использовали импеданс в качестве показателя, регистрируемого системой xCELLigence для оценки пролиферативной способности клеток [140]. Система измеряет электрический импеданс клеток с помощью микроэлектродов, расположенных на дне лунок E-Plate. Это позволяет оценить клеточный индекс, который отражает количественную информацию о биологическом статусе клеток, в том числе их количество и жизнеспособность. Образцы были приготовлены в виде клеточной суспензии (100 мкл), содержащей по 5 000 клеток, и посеяны на лунки в дублях. Значение клеточного индекса в каждой лунке автоматически регистрировалась в режиме «реального времени» на протяжении 72 часов с помощью системы xCELLigence. Данные анализировали в RTCA Software (версия 1.0.0.1304).

2.4.5 Анализ скорости миграции мезенхимных клеток сердца крыс

Методика оценки миграционной активности МКСк проводилась с использованием теста "scratch": после формирования монослоя клеток культуральную среду заменяли на среду без добавления сыворотки, содержащую гидроксимочевину (10 мМ) для ингибирования клеточной пролиферации, а также добавляли фактор роста PDGF-BB (10 нг/мл) [141]. В слое клеток на дне чашки создавали искусственную царапину и последующим анализом фиксировали количество клеток, мигрировавших на поврежденный участок через 12, 24 и 36 часов.

2.4.6 Индукция гипоксии *in vitro*

Для индукции гипоксии *in vitro* использовали здоровые МКСк, полученные от ложнооперированных крыс. Клетки сеяли на чашки Петри (5 см) и культивировали в среде для МКС. На следующий день клетки переводили в инкубатор с регулируемым уровнем кислорода.

МКСк инкубировали при 1% или 5% O₂ (37°C, 5% CO₂, 99% влажность) в течение 8 или 24 часов. Контрольные МКСк инкубировали при 20% O₂ (37°C, 5% CO₂, 99% влажность).

МКСч инкубировали в Heracell 150 (Thermo Scientific, США) при 1,0% или 5,0% O₂, 5,0% CO₂, и 94% или 90% N₂ соответственно, в течение 6–72 часов. Контрольные МКСч инкубировали при 21% O₂, 5,0% CO₂ и 74% N₂. Клетки анализировали сразу после инкубации, чтобы избежать влияния нормоксии.

2.4.7 Иммуноцитохимическая окраска мезенхимных клеток сердца

Клетки на покровных стёклах после кардиогенной дифференцировки, фиксировали в чашках Петри (10 см) 4%-ным параформальдегидом 12 мин на льду. Стекла с клетками промывали в ФСБ, обрабатывали 0.5%-ным тритоном X-100 на ФСБ 3 мин, инкубировали в 1%-ном БСА на ФСБ 40 мин, и ограничивали область вокруг стекла гидрофобным маркером. На стекла наносили первичные антитела к α -актину 1:200 (Invitrogen, США) в БСА и инкубировали во влажной камере 1 ч при комнатной температуре. Затем промывали стекла в ФСБ и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488, 1:10000 в темноте 40 мин при комнатной температуре. После промывки в ФСБ окрашивали ядра DAPI (Invitrogen, США) 1:10000 с ФСБ 5 с и монтировали стекла с клетками на предметные стекла с Fluoromount (Sigma, США). Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия).

2.4.8 Эндотелиальные клетки пупочной вены человека

Эндотелиальные клетки получали из пупочной вены человека (ПВЭК) методом ферментативной диссоциации ткани [142]. Вену заполняли 0,1% раствором коллагеназы II (Worthington Biochemical Corporation, США) и помещали в инкубатор на 10 мин при 37°C в растворе ФСБ [143]. Клеточную суспензию с раствором коллагеназы центрифугировали 5 мин при 300 g. Супернатант забирали, а клеточный осадок ресуспендировали и переносили на чашки Петри, покрытые 0,2% желатином (Sigma-Aldrich, США). ПВЭК культивировали в среде ЕСМ (ScienCell, Канада) при температуре 37°C и 5% уровне углекислого газа CO₂.

2.4.9 Сокультивирование культур эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека

Клеточные культуры ПВЭК и МКСч были посеяны совместно друг с другом в двух разных комбинациях: когда сначала посеяли МКСч, а затем ПВЭК, и наоборот. Вторые клеточные культуры были посеяны через 24 часа после первых культур. Клетки культивировались в 12-луночных планшетах (для выделения общей тотальной РНК, 75 000 клеток на лунку) и 6-луночных планшетах (для окрашивания α -SMA, 25 000 клеток на лунку), покрытых 0,2% желатином в специальной среде для культивирования эндотелиальных клеток ЕСМ (ScienCell, Канада).

2.5 Плазмиды

Для конструирования лентивирусных векторов использовали плазмиду pLVTHM, предоставленную профессором D. Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Швейцария). На её основе сделали конструкцию с геном внутриклеточного домена Notch1 (NICD) [132, 144, 145].

2.5.1 Производство лентивирусных частиц

Для получения лентивирусных частиц использовали протокол, разработанный в лаборатории профессора Д. Троне (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Швейцария) и адаптированный в лаборатории Томилина А. Н. [144]. Лентивирусные частицы нарабатывали с помощью клеток первичной почки человека 293-Т (HEK293-Т) [144]. HEK293-Т культивировали

в среде, содержащей DMEM (Gibco), 10% фетальная бычья сыворотка (ФБС) (Gibco) и 1% смеси пенициллин-стрептомицин (Invitrogen) в инкубаторе (37°C, 5% CO₂, 99% влажность). Эффективность экспрессии трансгена с NICD-несущим вирусом была подтверждена с помощью ПЦР «в реальном времени» с праймерами к целевому гену Notch1 - *HEY1*.

2.5.2 Трансдукция культур эндотелиальных клеток пупочной вены и мезенхимных клеток сердца человека лентивирусными векторами BMP2 и NICD

Лентивирусная трансдукция была выполнена во время посева клеточной культуры путём добавления 25 мкл вирусного концентрата, либо с NICD, либо с BMP2. В случае двойной трансдукции вектор NICD был добавлен через 18 часов после посева клеток и первоначальной трансдукции с лентивирусом, несущим BMP2.

2.6 Анализ генной экспрессии

Для анализа экспрессии генов использовали ПЦР в реальном времени. РНК из клеток выделяли с помощью ExtractRNA (Евроген, Россия) и обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию и чистоту РНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 7500 (Wilmington, США). Качество РНК проверяли с помощью электрофореза с силой тока 80 мА на камерах BioRad (США) в 1%-ном агарозном геле. Обратную транскрипцию делали с MMLV RT (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени делали с геноспецифическими праймерами на LightCycler 480 (Roche, Швейцария). Для ПЦР в реальном времени использовали 5-кратную смесь qPCR mix-HS SYBR с SYBR Green I (Евроген, Россия). К смеси добавляли кДНК (50 нг), праймеры (10 мкМ каждый) и доводили объем до 25 мкл стерильной водой. Используемые последовательности праймеров для МКСк отражены в **таблице №1**.

<i>Название гена</i>	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
<i>Bmp2</i>	CTGCCATGGGGAATGTCCTT	TGCACTATGGCATGGTTGGT
<i>Cnd1</i>	CTTACTTCAAGTGCGTGCAAG	TTCATCTTAGAGGCCACGAACA
<i>Dll1</i>	TAACCCCGATGGAGGCTACA	GCACCGTTAGAACAAGGGGA
<i>Dll4</i>	GCAGCTGTAAGGACCATGAGA	TTCACAGTGCTGGCCATAGT
<i>Fabp4</i>	TGGGCGTGGAATTCGATGAA	CACATGTACCAGGACCCAC

<i>Gapdh</i>	CCAGTATGACTCTACCCACG	CATTTGATGTTAGCGGGATCTC
<i>Hes1</i>	ACCAAAGACAGCCTCTGAGC	TTGGAATGCCGGGAGCTATC
<i>Hes7</i>	CATCAACCGCAGCCTAGAAGAG	CACGGCGAACTCCAGTATCTCT
<i>Hey1</i>	CCTGGCTATGGACTATCGGAG	AGGCATCGAGTCCTTCAATGAT
<i>Hif-1a</i>	GGCGAGAACGAGAAGAAAAATAGG	AGATGGGAGCTCACGTTGTG
<i>Jag1</i>	CGCCCAATGCTACAATCGTG	TCTTGCCCTCGTAGTCCTCA
<i>Myc</i>	CAGCTCGCCCAAATCCTGTA	TGATGGGGATGACCCTGACT
<i>Notch1</i>	CAATGAGTGTGACTCACGGC	GCACAAGGTTCTGGCAGTTG
<i>Notch2</i>	CCGTGGGGCTGAAGAATCTC	CTTTCTTTGGCTGGGGTCCT
<i>Notch3</i>	GCCTAGTCCAGTGCCTGGCTACTG	GGGAACAGATATGGGGTGTGG
<i>Runx2</i>	TCCCTCCGAGACCCTAAGAAA	GCTGCTCCCTTCTGAACCTAC
<i>Tnnt2</i>	CAGGCTCTTCATGCCCAACT	GCTCGTTCAGGTCCTTCTCC
<i>Vegf-a</i>	GCAGCGACAAGGCAGACTAT	TGGCACGATTTAAGAGGGGA
<i>Vim</i>	TGCCAACCGGAACAACGAT	ACTGCACCTGTCTCCGGTA

Таблица №1. Перечень праймеров, использованных для оценки экспрессии генов в МКСк, с помощью полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

Используемые последовательности праймеров для МКСч отражены в **таблице №2.**

Название гена	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
<i>ACTA2</i>	GTTACTACTGCTGAGCGTGAG	CAGGCAACTCGTAACTCTTC
<i>ACTN1</i>	GCAACGACCCCCAGAAGAAGA	GTTGTAACCCATGGAGATCAGGC
<i>BMP2</i>	GCCAAGCCGAGCCAACAC	CCCACTCGTTTCTGGTAGTTCTTC
<i>DLL4</i>	AGGCCTGTTTTGTGACCAAG	CTCCAGCTCACAGTCCACAC
<i>GAPDH</i>	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
<i>HES1</i>	AGCACAGAAAGTCATCAAAG	AGGTGCTTCACTGTCATTTTC
<i>HEY1</i>	TGGATCACCTGAAAATGCTG	CGAAATCCCAAACCTCCGATA
<i>HEY2</i>	AGCAGGGCCGGAGACCTAGAT	GCCCCACGCCCTGTTTCTTTGA
<i>HPRT</i>	TGACACTGGCAAACAATGCA	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT
<i>JAG1</i>	TGCCAAGTGCCAGGAAGT	GCCCCATCTGGTATCACACT
<i>MEF2C</i>	CCAACTTCGAGATGCCAGTCT	GTCGATGTGTTACACCAGGAG

<i>NKX2.5</i>	CCAAGGACCCTAGAGCCGAA	ATAGGCGGGGTAGGCGTTAT
<i>NOTCH1</i>	GTCAACGCCGCTAGATGACC	TTGTTAGCCCCGTTCTTCAG
<i>NOTCH2</i>	ATGGTGGCAGAACTGATCAAC	TTGGCAAATGGTCTAACAGG
<i>NOTCH3</i>	GGAGCCAATAAGGACATGCAGGAT	GGCAAAGTGGTCCAACAGCAG
<i>NOTCH4</i>	GTTGTGACAGGGTTGGGACT	CAGCCCAGTGGGTATCTCTG
<i>RUNX2</i>	GAGTGGACGAGGCAAGAGTT	GGGTCCCGAGGTCCATCTA
<i>SNAI1</i>	CTCTTTCCTCGTCAGGAAGC	GGCTGCTGGAAGGTAAACTC
<i>SNAI2</i>	TCCAGACCCTGGTTGCTTCA	GAATGGGTCTGCAGATGAGCC
<i>TWIST1</i>	TGAAGATGCTTCAGGCAACAGGG	CGCAACTTCTGTTAGGCACTCTCG

Таблица №2. Перечень праймеров, использованных для оценки экспрессии генов в МКСч, с помощью полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени».

РТ-ПЦР была выполнена на системе LightCycler480 (Roche Diagnostics, Индианаполис, США) с использованием специальных прямых и обратных праймеров для генов-мишеней. Количественная ПЦР проводилась в течение 45 циклов. Анализ данных выполнялся с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$; относительная экспрессия генов была нормализована по гену *GAPDH*. Данные по экспрессии генов были проанализированы с помощью GraphPad Prism 9.4.1 (458) (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). Значения были выражены в медианном и межквартильном диапазоне. Группы сравнивались с использованием непарного непараметрического теста Манна-Уитни. Значение $P \leq 0,05$ было сочтено значительным.

2.7 Подготовка библиотек для секвенирования РНК

В работе использовали постинфарктные и здоровые ткани миокарда левого желудочка крыс, полученных от ишемизированных и ложнопериорированных крыс, соответственно. К тому же, были использованы МКСч, выделенные из постинфарктного и здорового участков сердца. Суммарную РНК выделяли по протоколу производителя (Евроген, Россия) из постинфарктных тканей и кМСК (по $n = 3$). Качество и количество выделенной РНК проверяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) и биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent Technologies). 1 мкг тотальной РНК использовали для создания библиотек с использованием набора для подготовки образцов TruSeq RNA (Illumina) в соответствии с протоколом для образцов с низким содержанием нуклеиновых кислот (LS) из инструкции производителя.

2.8 Дифференциальный анализ экспрессии генов

Необработанные чтения RNASeq были выровнены с помощью STAR 2.7 относительно Rnor_6.0 (GCA_000001895.4) и аннотаций транскриптов (ensembl 97) [146]. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета DESeq2 Bioconductor [147]. Гены с p -значением 0,05 или меньше назывались дифференциально экспрессируемыми генами. Сравнения были сделаны между ишемизированными тканями/клетками и контрольными тканями/клетками. Анализ и визуализация данных (PCA Plot и Volcano Plot) выполнялись с помощью Phantasus (версия: 1.7.3, сборка: master-709) [148].

2.9 Анализ путей *Ingenuity*

Биоинформатический анализ был выполнен при помощи программного обеспечения «анализа путей *Ingenuity*» (IPA; Qiagen Silicon Valley, Redwood City, California, USA, <http://www.ingenuity.com>). Набор дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) использовался для определения взаимодействий между генами внутри генных сетей на основе значений характерных именно *Rattus norvegicus*. Специфичность связей внутри сети для каждого ДЭГ рассчитывали по проценту его связей с другими значимыми генами в базе данных. Анализ канонических сигнальных путей проводили на основе библиотек сигнальных путей IPA.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Механизмы активации регенеративного потенциала мезенхимных клеток сердца

Задачей данного раздела работы было изучение механизмов ранней активации регенеративных процессов в постинфарктной ткани. Поскольку были накоплены данные о том [149], что механизмы функционального восстановления миокарда, скорее всего, заключены в паракринной межклеточной сигнализации, то их активация может происходить именно в период раннего ответа на повреждение. В связи с этим был проведён анализ ранних транскрипционных событий в сердечной ткани после инфаркта, а также изучена клеточная популяция, которая была выделена из постинфарктной ткани миокарда.

3.1.1 Профиль экспрессии генов значительно изменяется в тканях миокарда через 24 часа после инфаркта

Для осуществления анализа ранних транскрипционных событий, происходящих в сердце в результате гипоксии у крыс линии Wistar, был индуцирован острый инфаркт миокарда путём лигирования левой коронарной артерии. Затем был выделен постинфарктный участок миокарда с периинфарктной зоной из ишемизированного сердца спустя сутки после операции. В качестве контроля был взят здоровый миокард, полученный от крыс с «ложной» операцией. С помощью метода секвенирования РНК определяли генетический профиль постинфарктных и здоровых тканей миокарда [23].

Анализ главных компонент (ГКА) показал значительную вариабельность данных (**рисунок 6**). Транскрипционные профили постинфарктных и здоровых тканей были разделены и образовывали отдельные кластеры [23].

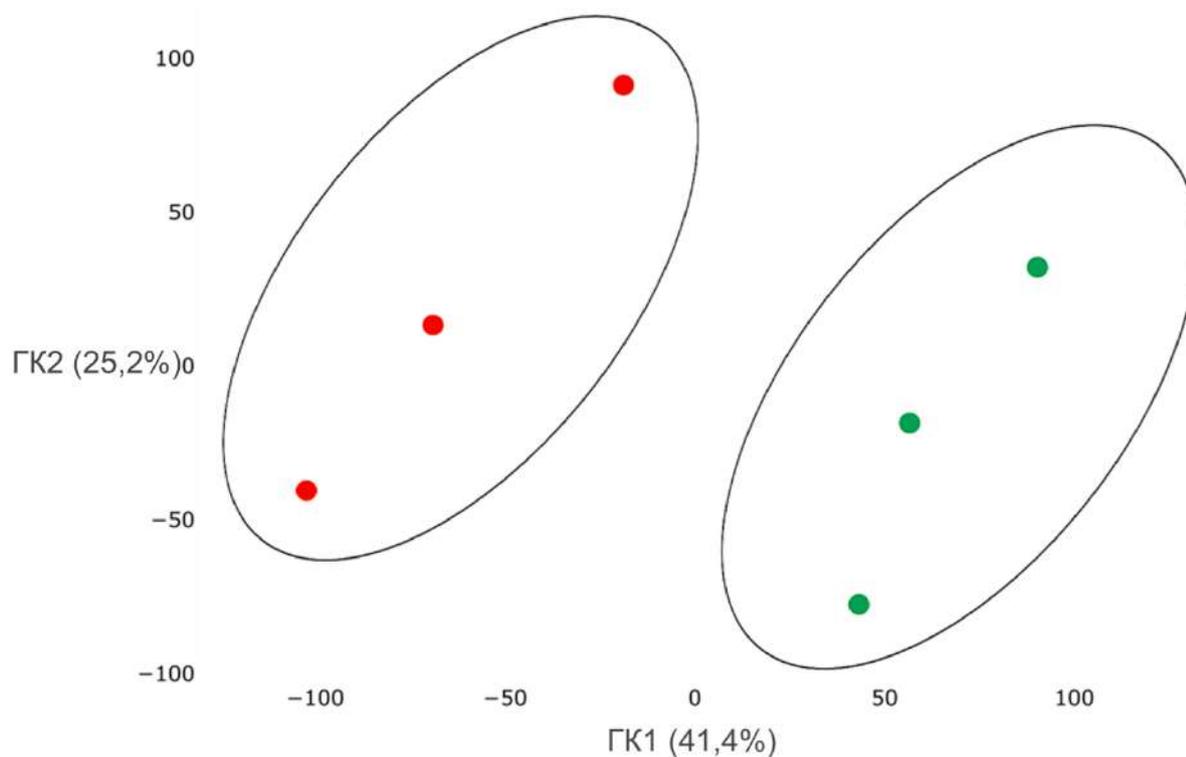


Рисунок 6. Анализ главных компонент (ГКА) показывает вариабельность экспрессии генов в здоровых (зеленые точки, $n = 3$) и постинфарктных (оранжевые точки, $n = 3$) тканях миокарда с использованием веб-инструмента Phantasus. На главный компонент 1 (ГК1) по оси X и ГК2 по оси Y приходится 41,4% и 25,2% общей изменчивости экспрессии генов, соответственно. ГК1 охватывает значительную часть (41,4%) экспериментальной вариабельности и, по большому счёту, отражает различие между двумя состояниями сердечной мышцы. ГК2 представляет собой экспериментальную изменчивость (25,2%), связанную с различием в профиле генов между биологическими повторами (лабораторными животными). Образцы визуально разделены на две основные группы [23].

Анализ дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) показал, что в постинфарктных тканях был активирован 1241 ген, а 1256 генов было подавлено (adj. p-value <0,05) (**рисунок 7**).

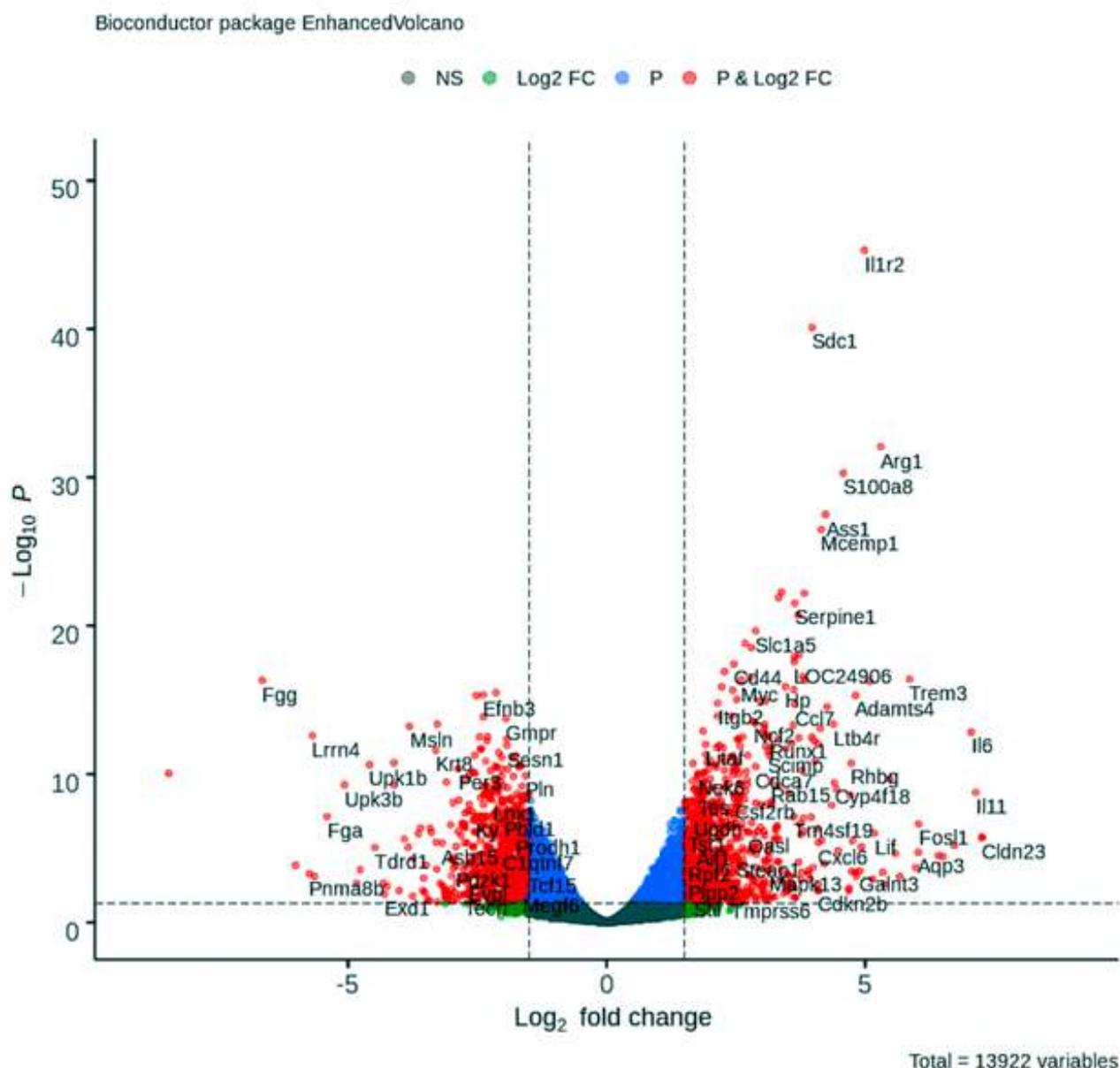


Рисунок 7. График Вулкан, показывающий дифференциально экспрессированные гены (adj. p-value <0,05) в постинфарктных образцах по сравнению с контролем, выполненное с использованием программного обеспечения Bioconductor в R. Ось Y соответствует среднему значению экспрессии $-\log_{10}$ (значение p), а по оси X отображается значение \log_2 (fold-change). Красные точки представляют собой дифференциально экспрессированные гены [23].

В топ-50 вошли ДЭГ, ассоциированные с эпителиально-мезенхимным переходом, характерным как при заживлении ран, так и при фиброзе (*Cd44*, *Gpc1*, *Sdc1*, *Vcan*, *Plaur*, *Serpine1*, *Ptpep1*, *Pvr*); гены, кодирующие белки, которые участвуют в гликолизе и глюконеогенезе (*Angptl4*, *Slc16a3*); гены, активируемые STAT5 в ответ на стимуляцию IL2 (*Myc*, *Slc1a5*, *Il1r2*, *Selp*), а также гены, регулируемые NF-kB в ответ на TNF, реагирующие на низкий уровень кислорода (при гипоксии) и определяющие воспалительную реакцию (таблица 3).

Ensembl ID	Ген	FDR-adjusted p-value	Log2 fold-change
ENSRNOG00000014378	<i>Illr2</i>	6,83E-42	4.9857
ENSRNOG00000059947	<i>Sdc1</i>	5,64E-37	3.9753
ENSRNOG00000013304	<i>Arg1</i>	3,94E-29	5.2988
ENSRNOG00000011557	<i>S100a8</i>	1,83E-27	4.5754
ENSRNOG00000008837	<i>Ass1</i>	8,86E-25	4.2348
ENSRNOG00000028259	<i>Mcempl</i>	7,57E-24	4.1490
ENSRNOG00000019202	<i>Pvr</i>	1,07E-19	3.3820
ENSRNOG00000002794	<i>Selp</i>	1,11E-19	3.8235
ENSRNOG00000015514	<i>Bcat1</i>	1,95E-19	3.3250
ENSRNOG00000001414	<i>Serpine1</i>	4,23E-19	3.6392
ENSRNOG00000019433	<i>Rab3a</i>	6,84E-11	-2.3064
ENSRNOG00000032989	<i>Lrrn4</i>	6,26E-11	-5.6887
ENSRNOG00000019445	<i>Msln</i>	1,62E-11	-3.8116
ENSRNOG00000026217	<i>Armc2</i>	1,27E-11	-3.2730
ENSRNOG00000017250	<i>Gmpr</i>	5,64E-12	-1.9489
ENSRNOG00000027230	<i>Fhod3</i>	4,49E-12	-2.3839
ENSRNOG00000018997	<i>Myh7b</i>	2,10E-13	-2.5206
ENSRNOG00000010320	<i>Efnb3</i>	1,95E-13	-2.3865
ENSRNOG00000018233	<i>Gas6</i>	1,46E-13	-2.1429
ENSRNOG00000025074	<i>Fgg</i>	2,70E-14	-6.6579
ENSRNOG00000017897	<i>Adam8</i>	2,44E-18	3.7035
ENSRNOG00000015948	<i>Slc1a5</i>	2,64E-17	2.8822
ENSRNOG00000020465	<i>Ripk3</i>	1,67E-16	2.6771
ENSRNOG00000018371	<i>Tubb6</i>	3,04E-16	2.7982
ENSRNOG00000036677	<i>Slc16a3</i>	8,34E-16	3.7188
ENSRNOG00000037931	<i>Plaur</i>	1,08E-15	3.6347
ENSRNOG00000002820	<i>LOC24906</i>	2,20E-15	3.6261
ENSRNOG00000006094	<i>Cd44</i>	3,01E-15	2.4605
ENSRNOG00000015845	<i>Fam129b</i>	9,25E-15	2.2808
ENSRNOG00000019141	<i>Ch25h</i>	1,88E-14	3.7877
ENSRNOG00000057676	<i>Polr2m</i>	8,93E-10	-1.7560
ENSRNOG00000020244	<i>Perm1</i>	8,43E-10	-2.5532
ENSRNOG00000021128	<i>Kcnj11</i>	5,82E-10	-2.0874
ENSRNOG00000009779	<i>Krt8</i>	4,17E-10	-3.3038
ENSRNOG00000033722	<i>Rnf207</i>	3,48E-10	-2.4232
ENSRNOG00000042912	<i>Mycbpap</i>	3,48E-10	-2.4412

ENSRNOG00000000302	<i>Sesn1</i>	2,24E-10	-1.9286
ENSRNOG00000026493	<i>Cdnf</i>	1,13E-10	-2.3146
ENSRNOG00000049437	<i>Gpc1</i>	9,36E-11	-1.9317
ENSRNOG00000019278	<i>Fsd2</i>	7,06E-11	-2.4557
ENSRNOG00000029212	<i>Vcan</i>	2,15E-14	2.7637
ENSRNOG00000013748	<i>Trem3</i>	2,49E-14	5.8579
ENSRNOG00000004500	<i>Myc</i>	2,67E-14	2.5965
ENSRNOG00000022859	<i>Trem1</i>	2,67E-14	3.8338
ENSRNOG00000029768	<i>Ccl12</i>	2,97E-14	5.0897
ENSRNOG00000014964	<i>Hp</i>	6,41E-14	3.4569
ENSRNOG00000050404	<i>Pmepa1</i>	6,41E-14	2.2242
ENSRNOG00000007545	<i>Angptl4</i>	1,00E-13	3.6166
ENSRNOG00000020300	<i>Lsp1</i>	1,05E-13	2.4371
ENSRNOG00000003538	<i>Adamts4</i>	2,10E-13	4.8106

Таблица 3. Топ 50 ДЭГ в постинфарктных тканях миокарда крыс, отсортированных по статистическому критерию с использованием анализа DeSeq [23].

Таким образом, мы наблюдали значительное изменение паттерна экспрессии генов в раннем ответе на индукцию инфаркта в ткани миокарда, и определили ряд дифференциально экспрессируемых генов, реагирующих на повреждение сердечной мышцы.

3.1.2 В постинфарктном миокарде усиливаются процессы раннего ремоделирования, в которые вовлечены компоненты сигнальных путей NOTCH и BMP

Чтобы оценить влияние острого гипоксического стресса на нарушение регуляции канонических сигнальных путей и биологических функций в сердечной ткани через 24 часа после индукции инфаркта, мы провели анализ канонических сигнальных путей и обогащения набора генов (ОНГА) с использованием программного обеспечения Qiagen. Дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) были загружены в «Qiagen Ingenuity Pathway Analysis» (IPA) для выявления обогащенных путей в наборе данных после фильтрации по значимости (adj. p-value <0,05). Всего было идентифицировано около 152 канонических сигнальных и метаболических путей, значимость которых была выше $-\log(P) > 1.3$, и только 82 сигнальных путей имели абсолютные значения z-score более 1.0.

В сердце после инфаркта миокарда происходит массовая гибель клеток в зоне поражения и

стойкое формирование воспалительной реакции, в частности, направленной на обеспечение репаративных процессов, связанных с ранним ремоделированием миокарда [150]. Мы наблюдали сдвиг в характере экспрессии генов в сторону раннего ремоделирования миокарда через 24 часа после индукции острого инфаркта. Согласно этому, были выявлены следующие канонические сигнальные пути из проанализированного набора данных: аффективный сигнальный путь «Апелиновый сигнальный путь фибробластов сердца» (ratio — 0.455, z-score — -2.333, p-value — 5,67E-04), который ассоциирован с активацией сердечных фибробластов и их дифференцировкой в миофибробласты с последующим формированием сердечного фиброза, приводящего к сердечной недостаточности, «ремоделирование эпителиальных адгезионных контактов» (ratio - 0,382, z-score - 2,449, p-value - 1,71E-05), «ингибирование матриксных металлопротеиназ» (ratio - 0,344, z-score -1,265, p-value - 4,57E-03) и «передача сигналов TGF- β » (ratio - 0,218, z-score - 1,5, p-value - 4,86E-02) (**Рисунок 8**).

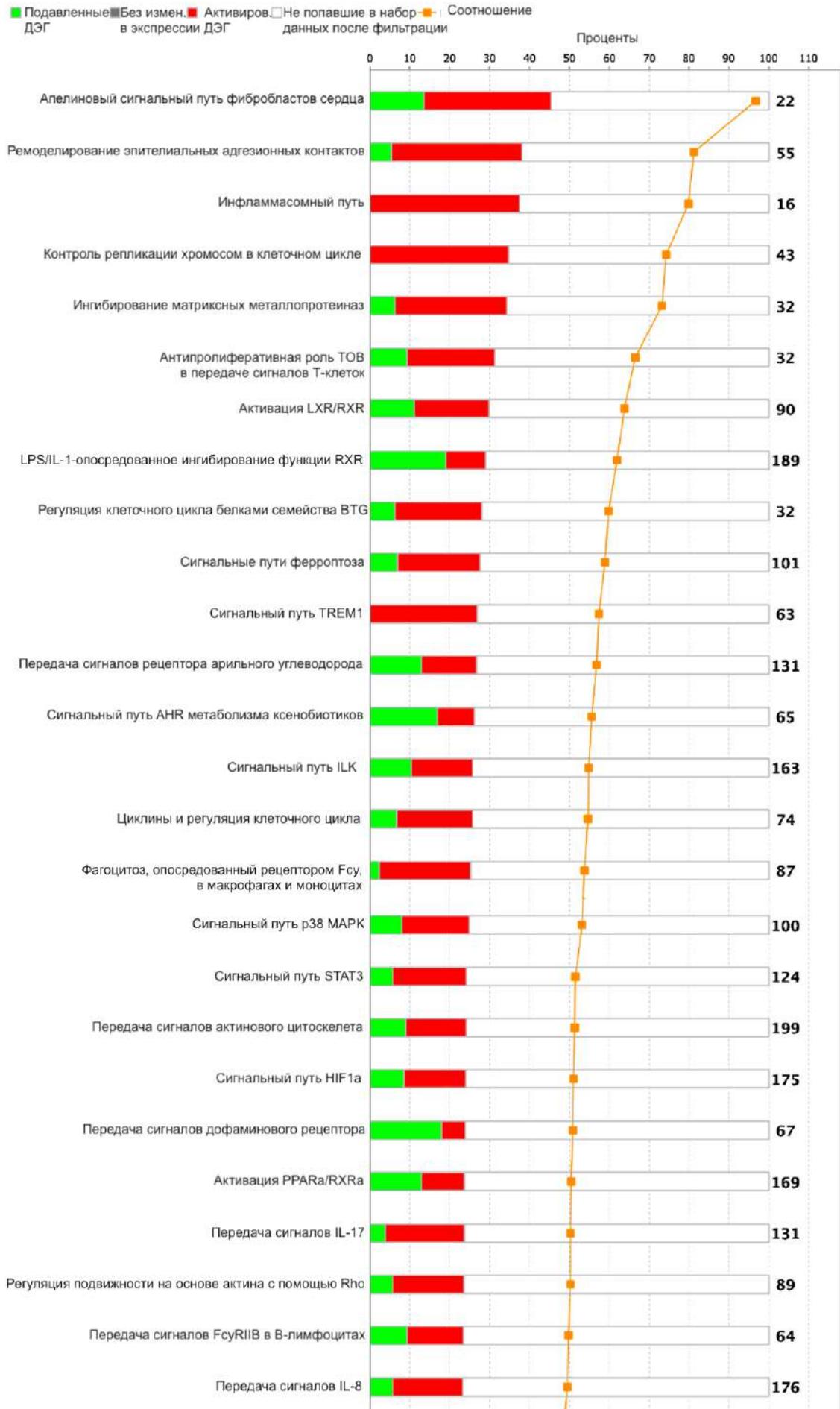




Рисунок 8. Дерегуляция биологических путей (за исключением метаболических путей) в образцах постинфарктной ткани, выявленная с помощью анализа IPA. Рисунок отражает дерегулируемые канонические сигнальные пути в виде гистограммы с накоплением по значению p-value, полученным методом точного критерия Фишера ($\text{adj. p-value} > 0.05$, $\text{z-score} > 1$) [23].

Кроме того, были отмечены сигнальные пути, участвующие в регуляции клеточного цикла и пролиферативной активности («контроль репликации хромосом в клеточном цикле», «передача сигналов PI3K/AKT», «передача сигналов рецептора арильного углеводорода», «регулирование клеточного цикла белками семейства BTG», «путь STAT3», «передача сигналов HIF-1 α », «циклины и регуляция клеточного цикла») и миграционной активности («регуляция подвижности на основе актина с помощью Rho», «передача сигналов актинового цитоскелета») также были

активированы в постинфарктных тканях.

Вероятностные сети генов, сгенерированные с помощью программы IPA, отражают формы неканонической передачи сигналов, которые были отмечены для различных генов с повышенной и пониженной экспрессией, участвующих в росте и развитии тканей и клеток (**рисунок 9**).

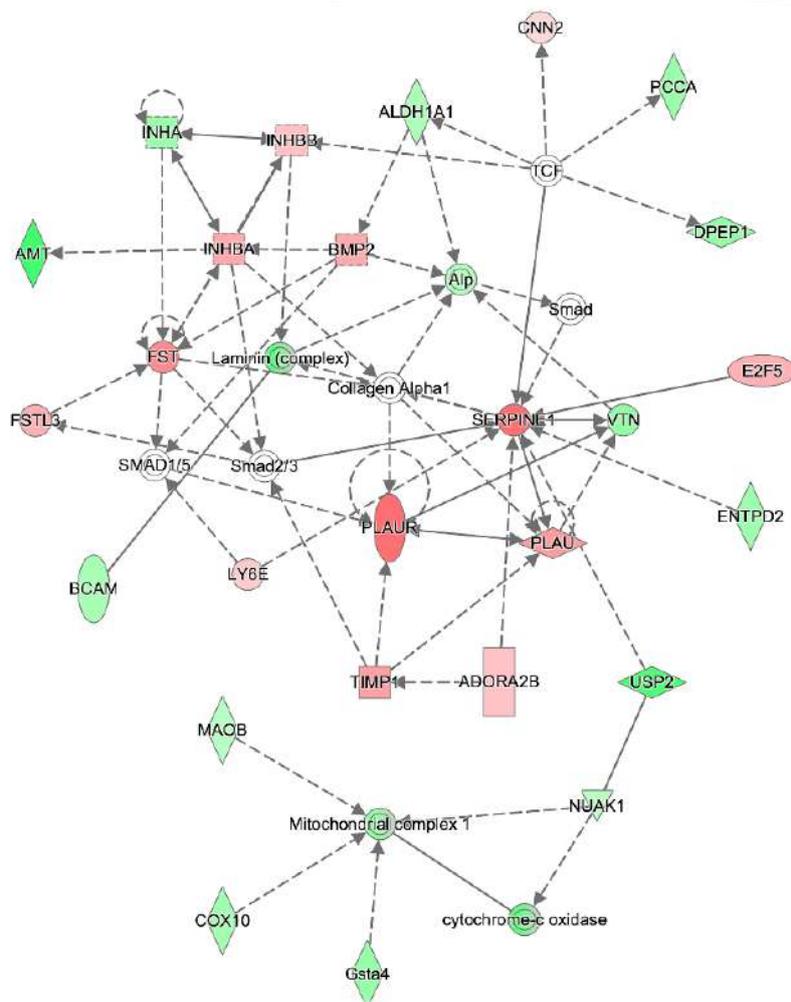


Рисунок 9. Дерегулируемые сети генов, ассоциированные с процессами роста и развития тканей и клеток, были сгенерированы с помощью программного обеспечения IPA. Красный цвет означает увеличение экспрессии, а зеленый — уменьшение. Яркость цвета означает интенсивность генной экспрессии в полученном наборе данных [23].

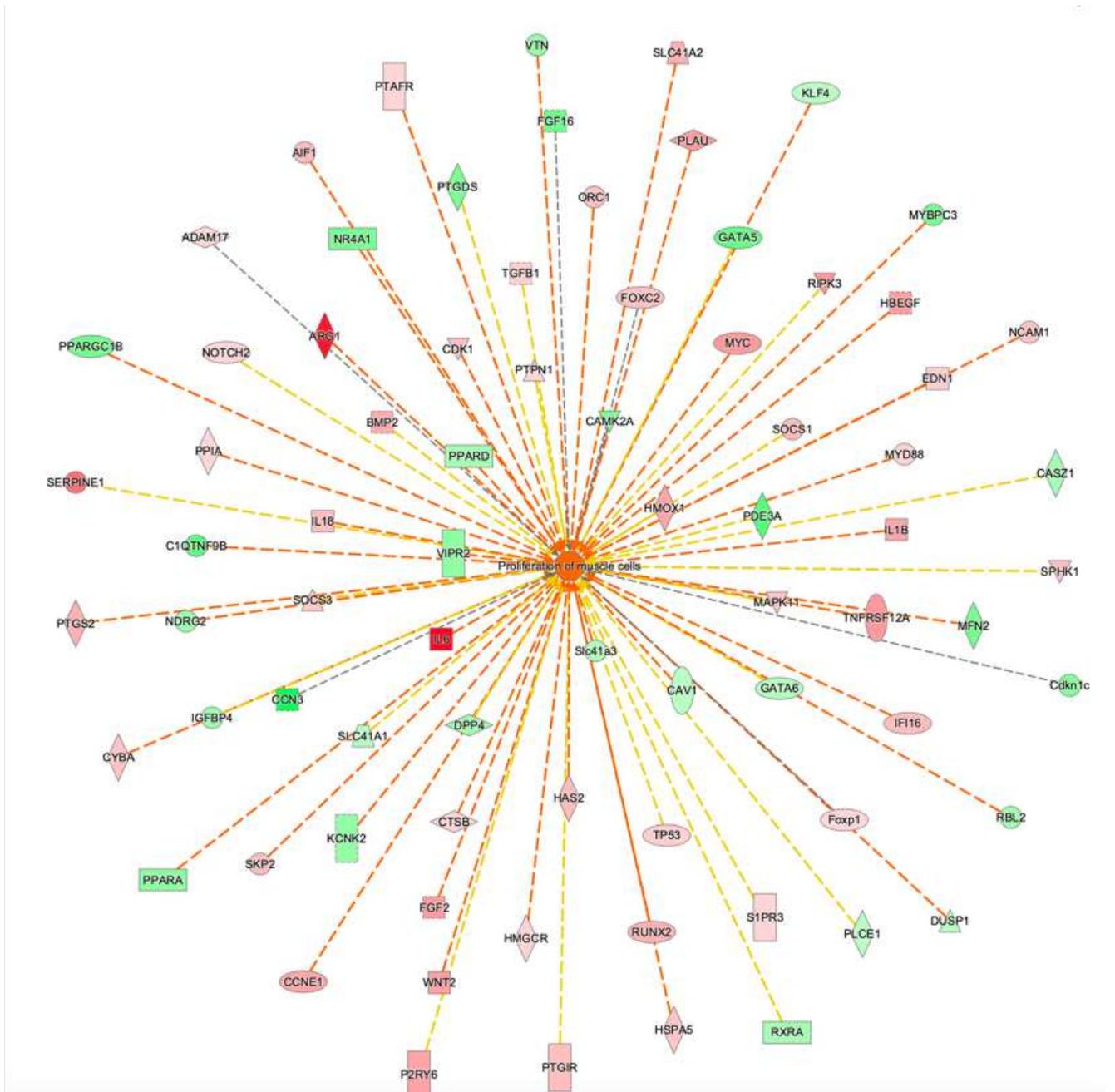
С помощью ОНГА было идентифицировано более 100 молекул, которые участвуют в формировании иммунного ответа, влияют на рост и развитие сердечно-сосудистой системы, процессы клеточного деления, изменения морфологии клеток. Основные дерегулируемые биологические функции и заболевания, с которыми были ассоциированы ДЭГ, отражены в виде **таблицы №4**.

Название	Диапазон P-value	Кол-во молекул
Системная физиология развития и функционирования		
Оборот иммунных клеток	1.45E-04–2.40E-23	341
Развитие и функционирование гематологической системы	1.93E-04–6.17E-21	552

Развитие организма	1.88E-04–7.23E-16	505
Выживание организма	1.44E-08–9.00E-16	638
Морфология тканей	2.20E-04–4.63E-15	411
Молекулярные и клеточные функции		
Клеточное движение	1.40E-04–3.50E-24	365
Клеточная смерть и выживание	2.20E-04–2.80E-16	400
Передача сигналов и взаимодействие между клетками	2.32E-04–5.63E-16	329
Функционирование и поддержание клеток	2.20E-04–1.46E-15	416
Синтез белков	2.26E-04–5.66E-14	228
Болезни и нарушения		
Воспалительная реакция	1.88E-04–4.23E-19	498
Повреждения организма и аномалии	2.27E-04–1.84E-15	864
Метаболические заболевания	1.89E-04–5.49E-14	280
Заболевания соединительной ткани	9.94E-05–1.69E-13	178
Кардиотоксичность		
Увеличение сердца	6.17E-01–5.00E-13	149
Сердечная дисфункция	3.43E-01–4.24E-09	74
Инфаркт сердца	5.90E-02–2.33E-07	34
Сердечный фиброз	3.81E-01–5.08E-07	74
Сердечная дилатация	3.81E-01–9.55E-07	57

Таблица 4. Топ заболеваний и биологических функций, затронутых в постинфарктных тканях, были выявлены с помощью IPA Software [23].

Среди дерегулируемых процессов встречается также пролиферация гладкомышечных клеток, дифференцировка соединительнотканых клеток и организация саркомеров в кардиомиоцитах (**рисунок 10**), что может свидетельствовать об активности данных процессов в ишемизированном сердце.



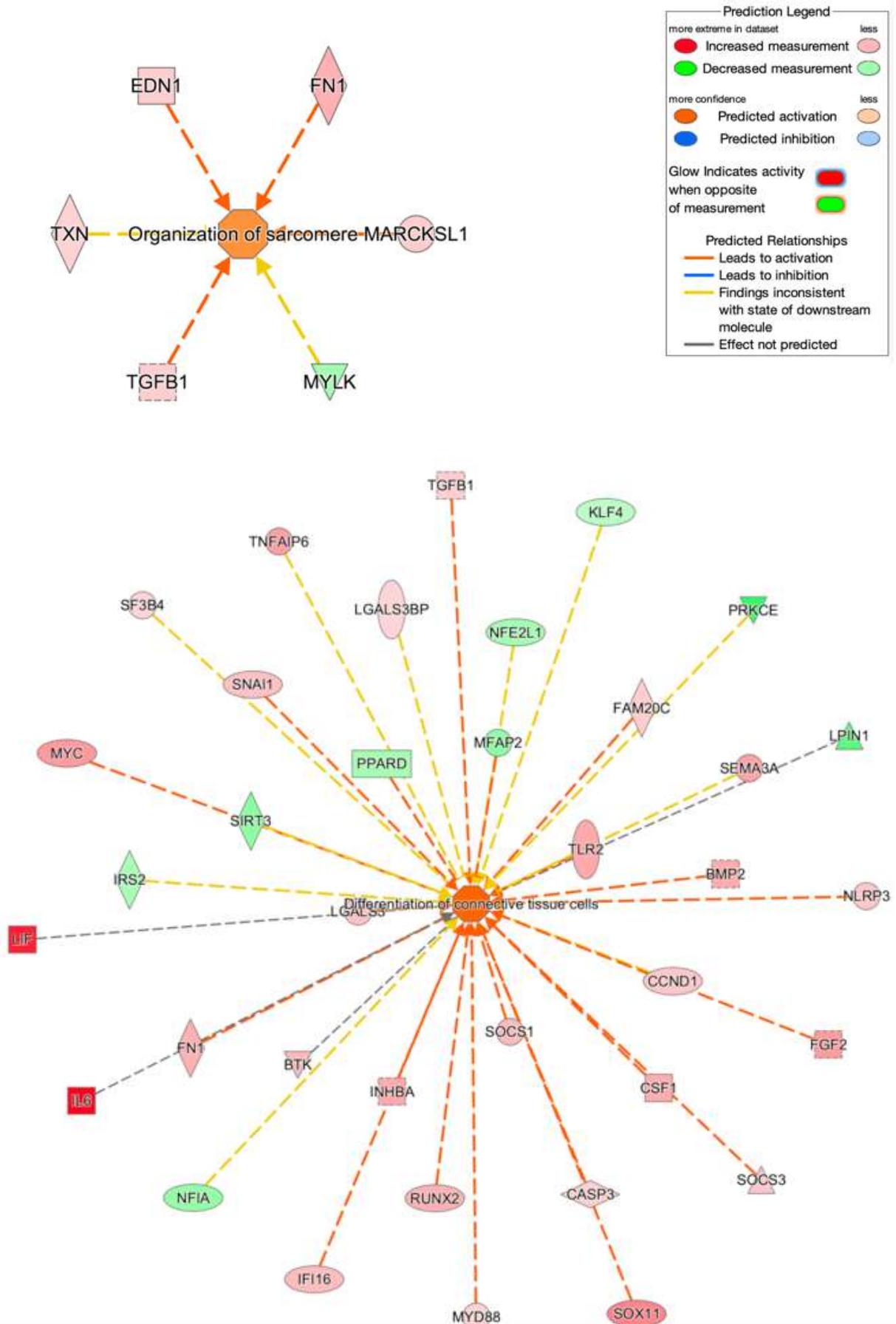


Рисунок 10. Активация биологических функций, ассоциированных с пролиферацией и дифференцировкой клеток сердца, которые были идентифицированы с помощью ОНГА в

программном обеспечении IPA. Красный цвет означает увеличение экспрессии, а зеленый — уменьшение. Яркость цвета означает интенсивность генной экспрессии в полученном наборе данных [23].

В процессах, отражённых выше, была отмечена активность нескольких компонентов сигнального пути Notch [151, 152], таких как рецептор *Notch2*, гены-мишени *Myc*, *Ccnd1* и фактор транскрипции *Runx2*, которые были активированы, а целевой ген *Hey1* – подавлен. В частности, среди ключевых регуляторов был активирован ген *Vmp2*, который кодирует одноименный лиганд из сверхсемейства белков TGF- β и вовлечён во многие процессы развития, включая кардиогенез, нейрогенез и остеогенез [153-155]. Полный список сверхэкспрессированных компонентов сигнального пути Notch представлен в виде таблицы (таблица 5).

Ensembl ID	Ген	<i>p-value</i>	Log2 fold-change
ENSRNOG00000004500	<i>Myc</i>	2,67E-14	2,5965
ENSRNOG00000059968	<i>Jak2</i>	9,13E-05	1,1905
ENSRNOG00000020918	<i>Ccnd1</i>	1,92E-04	1,4416
ENSRNOG00000020193	<i>Runx2</i>	8,87E-04	1,9919
ENSRNOG00000018835	<i>Notch2</i>	5,35E-03	1,0877
ENSRNOG00000013218	<i>Sap30</i>	8,97E-03	1,3621
ENSRNOG00000060694	<i>Adam17</i>	1,06E-02	1,0066
ENSRNOG00000006350	<i>Tle6</i>	7,26E-03	-1,6074
ENSRNOG00000050848	<i>Dtx1</i>	5,56E-03	-2,319
ENSRNOG00000005133	<i>Mapt</i>	2,12E-03	-1,5349
ENSRNOG00000008257	<i>Mfap2</i>	1,97E-03	-1,622
ENSRNOG00000015318	<i>Hey1</i>	5,74E-05	-1,5211
ENSRNOG00000008697	<i>Ccn3</i>	1,04E-05	-2,7564
ENSRNOG00000002272	<i>Lnx1</i>	3,22E-07	-2,2148
ENSRNOG00000018384	<i>Adam12</i>	3,12E-02	2,1
ENSRNOG00000059059	<i>Skp2</i>	3,68E-02	1,6709
ENSRNOG00000025100	<i>Ikbke</i>	4,20E-02	1,0854
ENSRNOG00000017259	<i>Tacc3</i>	4,94E-02	1,1216
ENSRNOG00000016640	<i>Dner</i>	3,28E-02	-1,755
ENSRNOG00000011593	<i>Hey1</i>	2,10E-02	-1,8048

Таблица 5. Компоненты сигнального пути Notch, которые дифференциально экспрессируются в постинфарктных тканях миокарда через 24 часа после операции [23].

Таким образом, установлено, что в постинфарктных тканях происходит реактивация генов, ассоциированных с процессами эмбрионального развития, в том числе была выявлена активация компонентов сигнального пути Notch и генов *Bmp2/Runx2*, которые могут быть связаны с ранним ремоделированием миокарда.

3.1.3 Активация компонентов сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2* в постинфарктных тканях миокарда

Чтобы подтвердить данные, полученные с помощью секвенирования РНК о том, что *Bmp2/Runx2* и компоненты сигнального пути Notch активируются в постинфарктных тканях, мы проанализировали их с помощью количественной ПЦР. Кроме того, мы выбрали еще более ранний момент времени после индукции инфаркта миокарда у крыс - 8 часов, чтобы оценить разницу в экспрессии генов между двумя временными точками.

Нами было установлено [23], что острая гипоксия *in vivo* активирует экспрессию компонентов сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2* в ишемизированном миокарде по сравнению со здоровым сердцем. Полученные данные количественной ПЦР полностью соответствовали результатам секвенирования РНК для 24-часовой точки (рисунок 11).

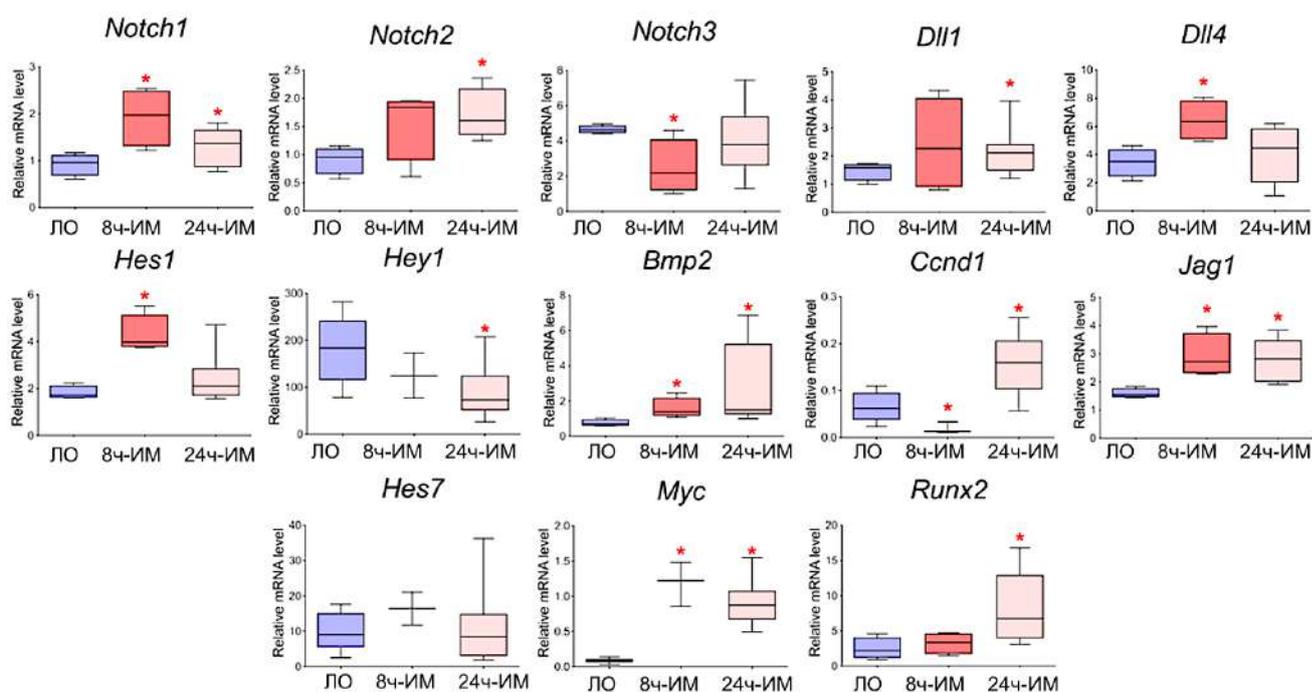


Рисунок 11. Динамика экспрессии компонентов сигнального пути Notch и генов *Bmp2/Runx2* в тканях по данным количественного ПЦР-анализа. ЛО – образцы из здорового миокарда от ложнооперированных крыс ($n = 3$), 8ч-ИМ – образцы из постинфарктных тканей миокарда крыс

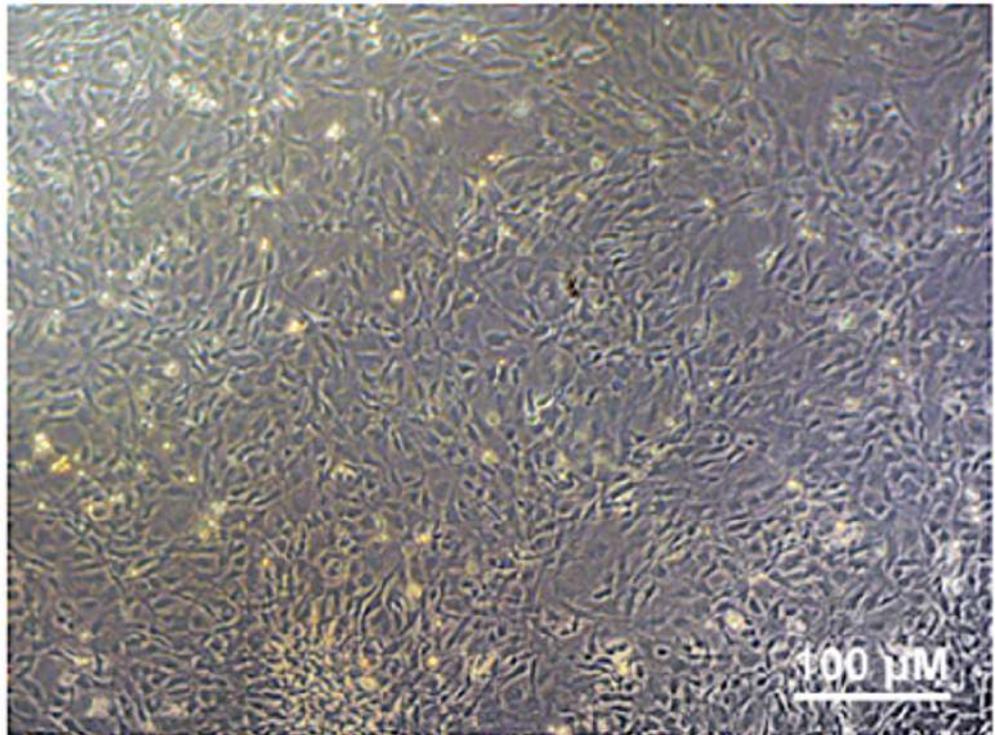
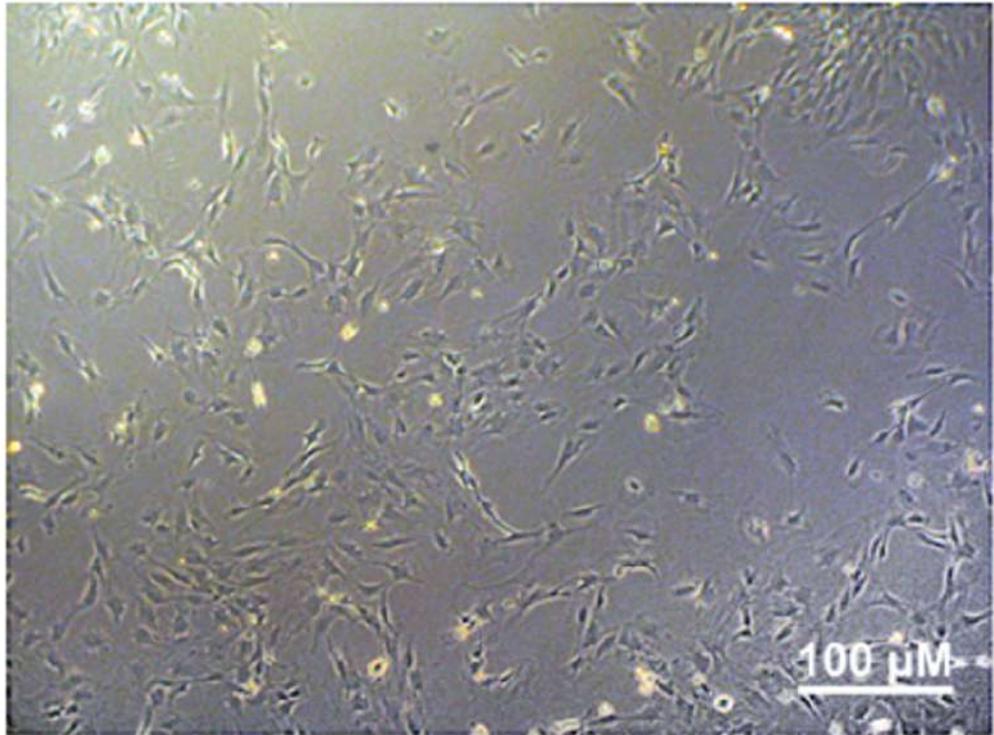
через 8 часов после индукции ($n = 4$), 24ч-ИМ - образцы из постинфарктных тканей миокарда крыс через 24 часа после индукции ($n = 9$). По вертикали - относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta CT}$; Представлены диаграммы с усами со значениями от минимума до максимума. Звёздочкой показаны достоверные различия между группами ЛО и ИМ при $p < 0.05$ (непарный непараметрический критерий Манна-Уитни) [23].

Таким образом, нами было отмечено, что результаты секвенирования РНК и количественной ПЦР в постинфарктных тканях миокарда сходятся друг с другом, и мы также наблюдали активацию компонентов сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2*, в том числе на ещё более ранней точке – 8 часов. Сохраняется ли активация в первичных культурах клеток из постинфарктного миокарда *in vitro* стало предметом нашего дальнейшего изучения.

3.1.4 Постинфарктные мезенхимные клетки сердца крыс обладают свойствами мезенхимных стволовых клеток и имеют выраженный потенциал к дифференцировке

Чтобы изучить свойства выделяемых клеток из постинфарктного миокарда *in vitro*, мы индуцировали инфаркт миокарда у крыс линии Вистар для получения первичных культур мезенхимных клеток сердца из постинфарктной области (включая периинфарктную зону) миокарда через 8 и 24 часа после операции; мезенхимные клетки сердца из миокарда желудочков здорового сердца ложнопериоперированных крыс использовали в качестве отрицательного контроля (рисунок 12).

ЛО-МКС



ИМ-МКС

Рисунок 12. Мезенхимные клетки сердца (МКС), полученные из здорового (ЛО-МКС) и постинфарктного (ИМ-МКС) миокарда крыс, на 5 день культивирования. МКСк выделяли через 24 часа после инфаркта миокарда. ЛО-МКС получали из сердец крыс после проведения ложной операции. Первичная культура клеток МКСк демонстрировала способность образовывать

колониобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) и обладала адгезией к культуральному пластику. Полученные клетки были способны к пролиферации в течение 20 пассажей [23].

Фенотипическая характеристика мезенхимных стволовых клеток (МСК) сложна, и международное общество клеточной и генной терапии установило следующие критерии для идентификации МСК: адгезия к пластику, экспрессия специфических маркеров, способность к адипогенной, хондрогенной и остеогенной дифференцировке, а также к образованию колониобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) [156]. Здесь мы используем термин мезенхимные клетки сердца (МКСк) из-за некоторых терминологических различий, связанных с правильной классификацией этих клеток [157, 158].

Полученные первичные культуры МКСк экспрессировали CD90 и были положительными по CD166, который ранее был описан как маркер резидентных мезенхимных клеток сердца и одной из популяций стволовых клеток сердца, полученных из кардиосфер [159]. Они также были отрицательными по эндотелиальным и гемопоэтическим маркерам [156], а именно по CD45, CD31, CD34 (рисунок 13).

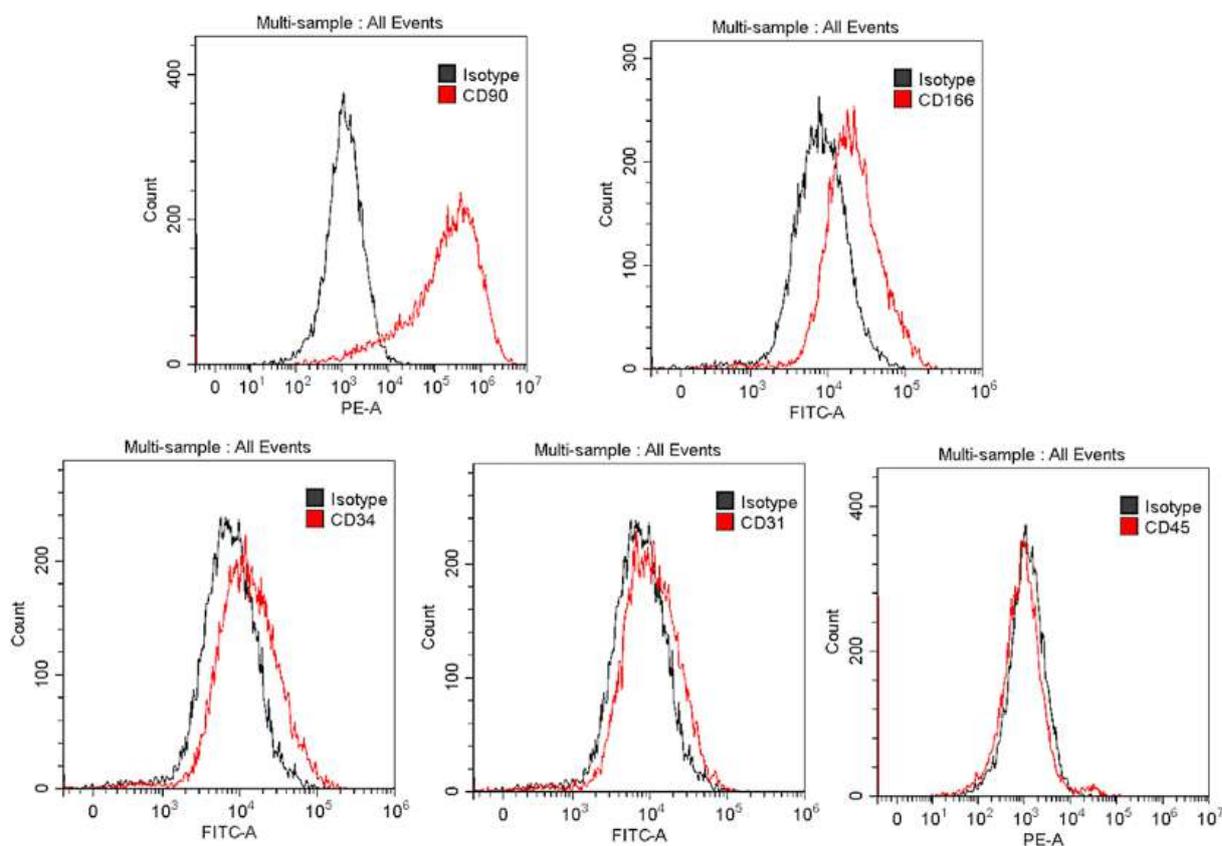


Рисунок 13. Иммунофенотипирование первичных культур МКСк с помощью проточной цитометрии. На гистограммах показаны уровни экспрессии поверхностных маркеров CD31,

CD34, C45, CD90 и CD166 (красные линии) в зависимости от изотипа (серые линии) [23].

Мезенхимные стволовые клетки могут дифференцироваться в разные типы клеток в зависимости от условий и химических индукторов [160]. Была проведена оценка потенциала мезенхимных клеток сердца крыс к дифференцировке в кардиогенном, остеогенном и адипогенном направлениях. Было продемонстрировано, что МКСк способны формировать α -актиновые филаменты через 24 дня после индукции кардиогенной дифференцировки. В присутствии адипогенных факторов, они накапливали липидные капли через 14 суток после начала дифференцировки, а интенсивное окрашивание МКСк на 21 сутки в виде выявления щелочной фосфатазы было зафиксировано при культивировании с остеогенными индукторами (**Рисунок 14**). Таким образом, полученные МКСк из миокарда крыс обладали характерными свойствами мезенхимных стволовых клеток в виде возможности к дифференцировке по различным направлениям [24].

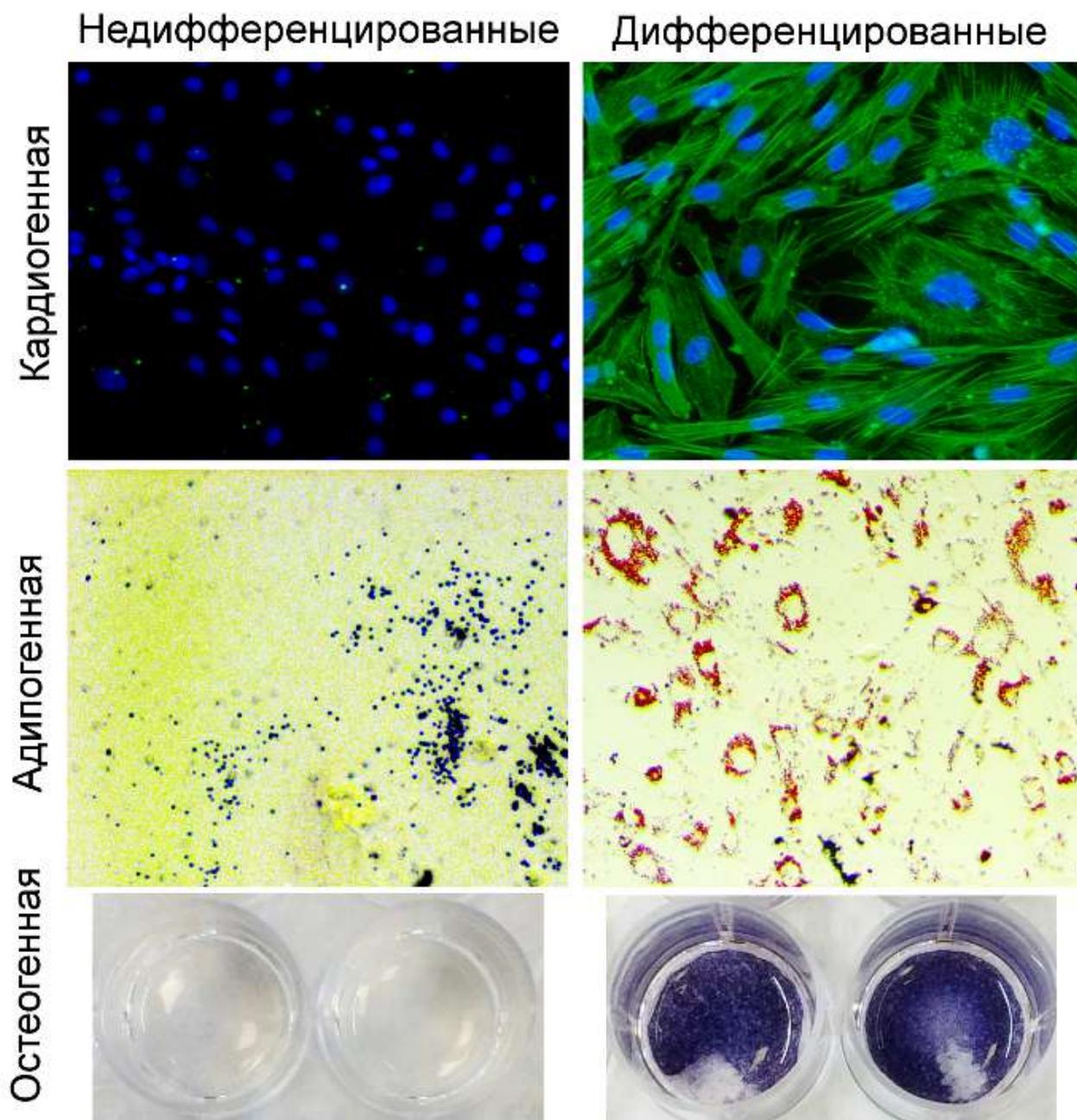


Рисунок 14. Кардиоогенная (зеленый цвет), адипогенная (красный цвет) и остеогенная (синий цвет) дифференцировка кМКС. Клетки дифференцировали путем добавления в среду культивирования специфических индукторов. Иммуноцитохимическое окрашивание на α -актинин и *DAPI*, окрашивание на жировые накопления (судановый красный) и щелочную фосфатазу (краситель NBT/BCIP) [161].

Для оценки специфичной дифференцировки была измерена экспрессия генов тропонина (*Tnnt2*), маркера кардиомиоцитов, и виментина (*Vim*), маркера фибробластов (рисунок 15, а). В зоне ишемии через 3 суток после инфаркта *Tnnt2* снижался, а *Vim* повышался, что свидетельствует о формировании фиброзного состояния и замещения погибших кардиомиоцитов [161].

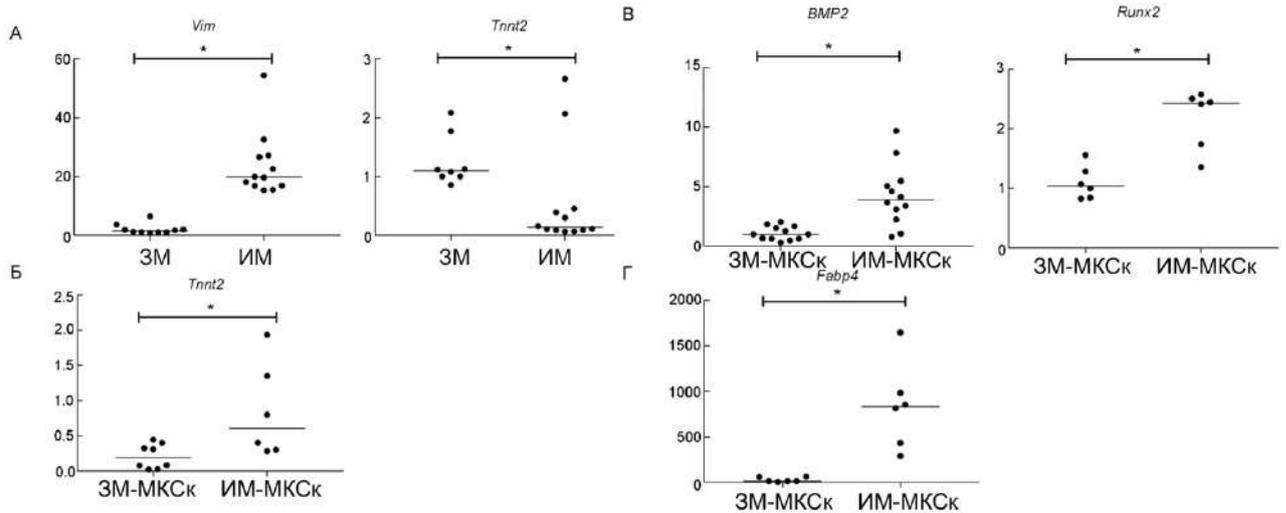


Рисунок 15. Экспрессия маркеров в тканях (а) и клетках (б, в, г) по данным количественной ПЦР. ЗМ-МКСк - здоровые клетки из миокарда, ИМ-МКСк - постинфарктные клетки из ишемизированного миокарда. На графике показано относительное количество мРНК для каждого гена по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$; звёздочкой отмечены статистически значимые различия между ЗМ-МКСк и ИМ-МКСк при $P < 0.05$. а - экспрессия мезодермального маркера (*Vim*) и кардиогенного маркера (*Tnnt2*) в ишемизированных и здоровых тканях. б - экспрессия гена тропонина Т2, кодирующего специфичную для кардиомиоцитов изоформу тропонина I, в клетках из ишемизированной зоны и миокарда при кардиогенной дифференциации. в - экспрессия *Bmp2* и *Runx2* (маркеров остеогенной дифференциации) в МКСк, дифференцированных в остеогенном направлении. г - экспрессия адипогенного маркера *Fabp4* в МКСк, дифференцированных в адипогенном направлении [161].

Было проведено сравнение способности к дифференцировке МКСк, полученных из постинфарктного участка миокарда, с МКСк из здорового миокарда. В результате индукции кардиогенной дифференцировки обнаружено повышение экспрессии гена *Tnnt2* (рисунок 15, б) в ИМ-МКСк по сравнению с ЗМ-МКСк. При индукции остеогенной дифференцировки наблюдалось усиление экспрессии *Bmp2* и *Runx2* (маркеров остеогенной дифференцировки) в ИМ-МКСк по сравнению с ЗМ-МКСк (рисунок 15, в). При индукции адипогенной дифференцировки выявлено повышение экспрессии *Fabp4* (маркера адипогенной дифференцировки) в ИМ-МКСк по сравнению с контролем (рисунок 15, г). Таким образом, увеличение экспрессии кардиогенных, остеогенных и адипогенных маркеров характерно для ИМ-МКСк, что свидетельствует о более выраженном потенциале этих клеток к дифференцировке в различных направлениях.

3.1.5 Постинфарктные мезенхимные клетки сердца крыс обладали способностью к активной пролиферации и миграции

Для оценки и сравнения пролиферативной активности постинфарктных и здоровых мезенхимных клеток сердца, полученных через сутки после оперативных вмешательств из

ишемизированного сердца, мы провели два функциональных теста в виде ручного подсчета для построения кривых роста и автоматического расчета с использованием системы xCELLigence для мониторинга пролиферации клеток в режиме реального времени.

Скорость роста постинфарктных мезенхимных клеток сердца (ИМ-МКСк) была значительно выше, чем у здоровых клеток (ЗМ-МКСк), полученных из здорового миокарда ишемизированного сердца, и эта тенденция сохранялась на протяжении 6 суток после посева клеток ($P < 0.05$) (рисунок 15).

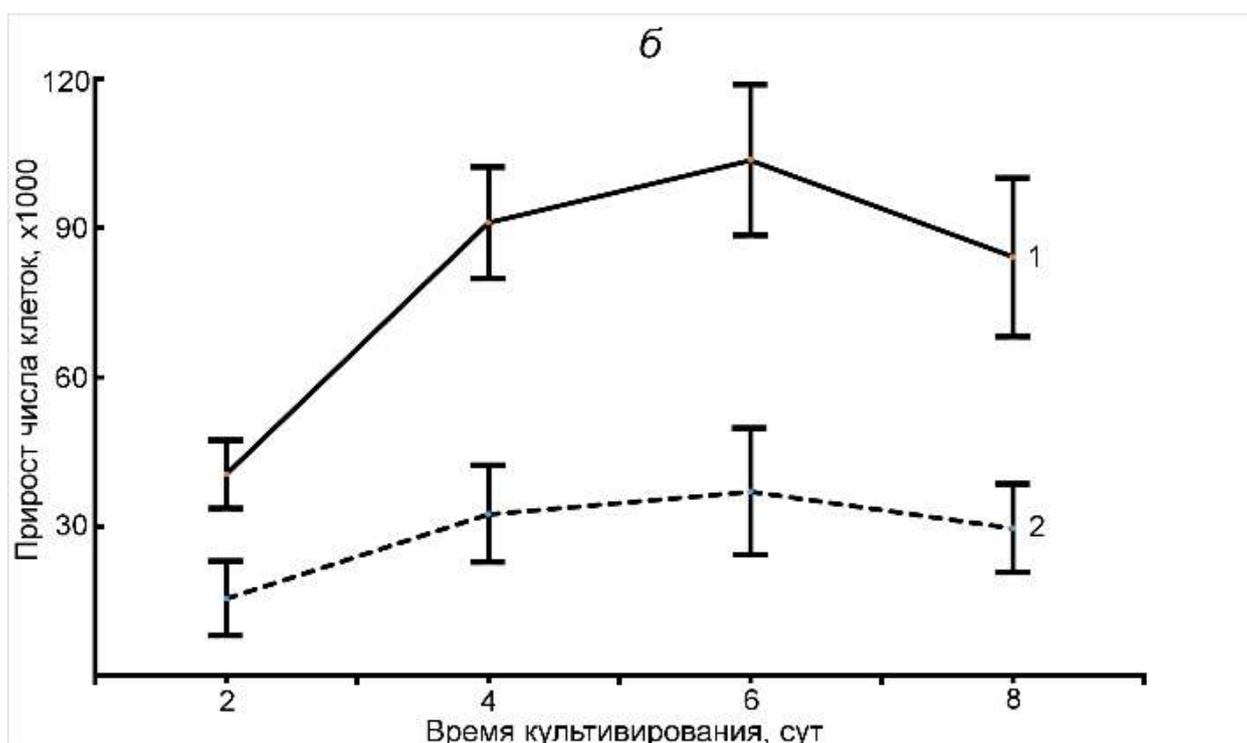


Рисунок 15. Скорость пролиферации ИМ-МКСк (кривая 1) и ЗМ-МКСк (кривая 2). Плотность посева клеток 10^3 кл./см²; показаны средние величины и стандартные отклонения (вертикальные отрезки). Достоверность различий между контрольной группой и постинфарктными МКС показана звездочкой [161].

Данные наблюдения также были подтверждены с помощью автоматического мониторинга пролиферации клеток в режиме реального времени, что ИМ-МКСк (оранжевая кривая) обладают более выраженным потенциалом к пролиферации и, соответственно, обладают активационным стимулом в ответ на острый гипоксический стресс, чем ЛО-МКСк (синяя кривая), полученные из здорового миокарда ложнооперированных крыс. Эксперимент длился 72 часа с периодичностью измерений каждые 15 минут (рисунок 16).

Пролиферативная активность

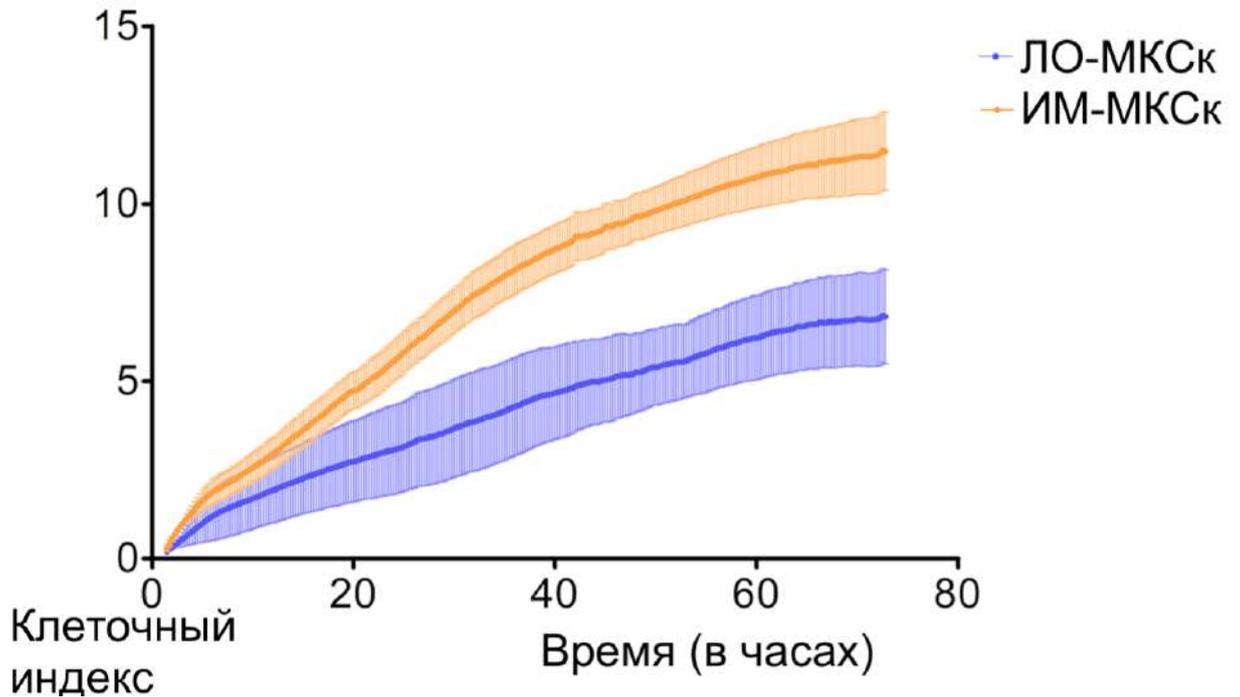


Рисунок 16. Скорость пролиферации постинфарктных мезенхимных клеток сердца (ИМ-МКСк, оранжевая кривая, $n = 9$) и здоровых мезенхимных клеток сердца, полученных от ложнооперированных крыс (ЛО-МКСк, синяя кривая, $n = 3$). Каждая кривая представляет средние значения между выборками и стандартную ошибку среднего (вертикальные линии). По горизонтали - время, в течение которого проводятся измерения пролиферативной активности каждые 15 минут. Эксперимент длился 72 часа. Вертикаль - значение клеточного индекса, отражающее количественную информацию о биологическом статусе клеток, в том числе об их количестве и жизнеспособности. Плотность посева составляла 5000 клеток на лунку. Значимость различий между ЛО-МКСк и ИМ-МКСк составляет $p < 0,05$ с помощью комплексного теста нормальности Д'Агостино и Пирсона [23].

Миграция клеток к месту повреждения - один из регенеративных механизмов. Был проведен функциональный тест на миграционную способность МКСк методом скретч-теста с количественным анализом [161]. ИМ-МКСк мигрировали в область царапины более интенсивно, чем ЗМ-МКСк ($P < 0.05$) (рисунок 17 а, б).

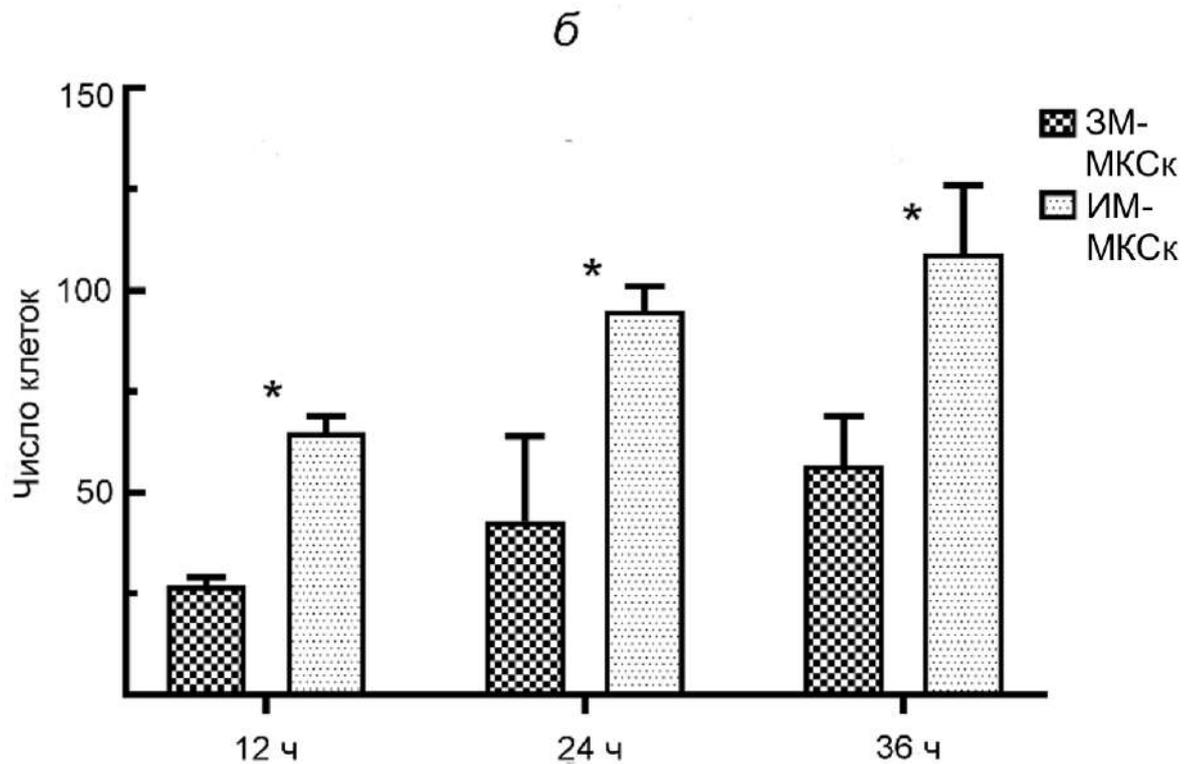
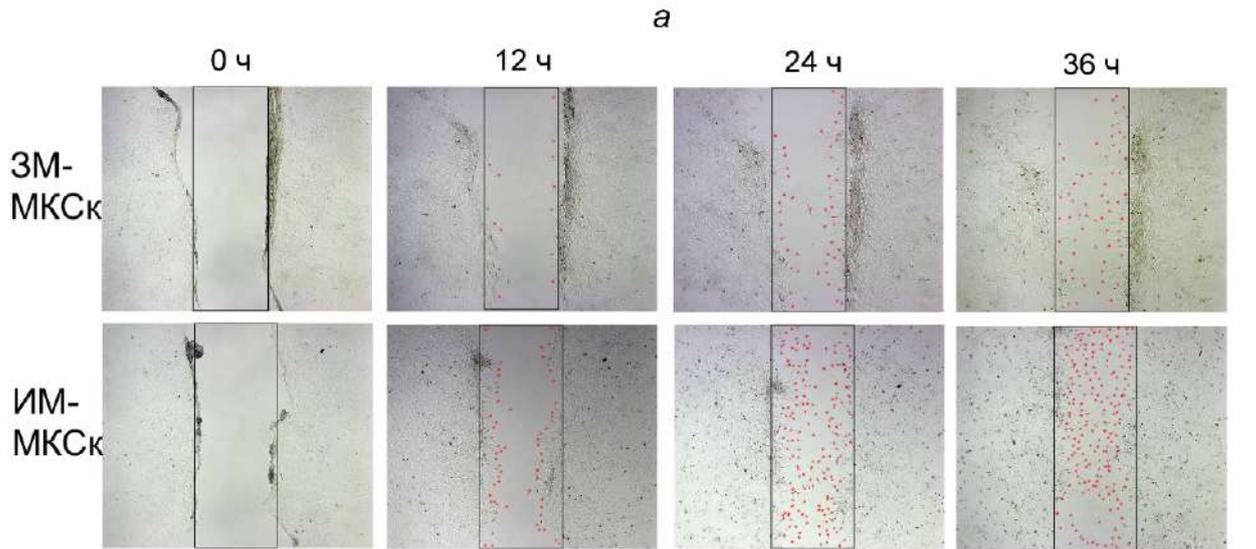


Рисунок 17. Миграция (*а*) и количественный анализ (*б*) МКСк в скретч-тесте из постинфарктных и здоровых участков ишемизированного миокарда. *а* – мигрирующие клетки в область царапины (выделена прямоугольником). 3М-МКСк – клетки из здорового участка миокарда, ИМ-МКСк – постинфарктные клетки. При образовании клеточного монослоя наносили царапину и считали число клеток через 12 ч, 24 ч и 36 ч. *б* – скорость миграции МКСк. Показана медиана с диапазоном (стандартное отклонение); звездочкой показаны достоверные различия между группами 3М-МКСк и ИМ-МКСк на каждом сроке при $P < 0.05$ [161].

Таким образом, было установлено, что ИМ-МКСк обладают более выраженным потенциалом к пролиферации и миграции в сравнении с популяциями здоровых клеток 3М-МКСк

и ЛО-МКСк.

3.1.6. Профиль экспрессии генов ИМ-МКСк был изменен

Чтобы оценить активацию ИМ-МКСк, мы проанализировали их транскриптомный профиль с помощью секвенирования РНК; в качестве контроля использовали ЛО-МКСк. Анализ главных компонент показал основные закономерности в полученном наборе данных. На главный компонент 4 (ГК4) приходится незначительная часть экспериментальной изменчивости (14,5%, $P < 0,05$), и отражает относительно небольшую разницу между двумя состояниями МКСк, что может свидетельствовать о постепенном изменении профиля экспрессии при культивировании клеток в нормальных условиях (**рисунок 18**).

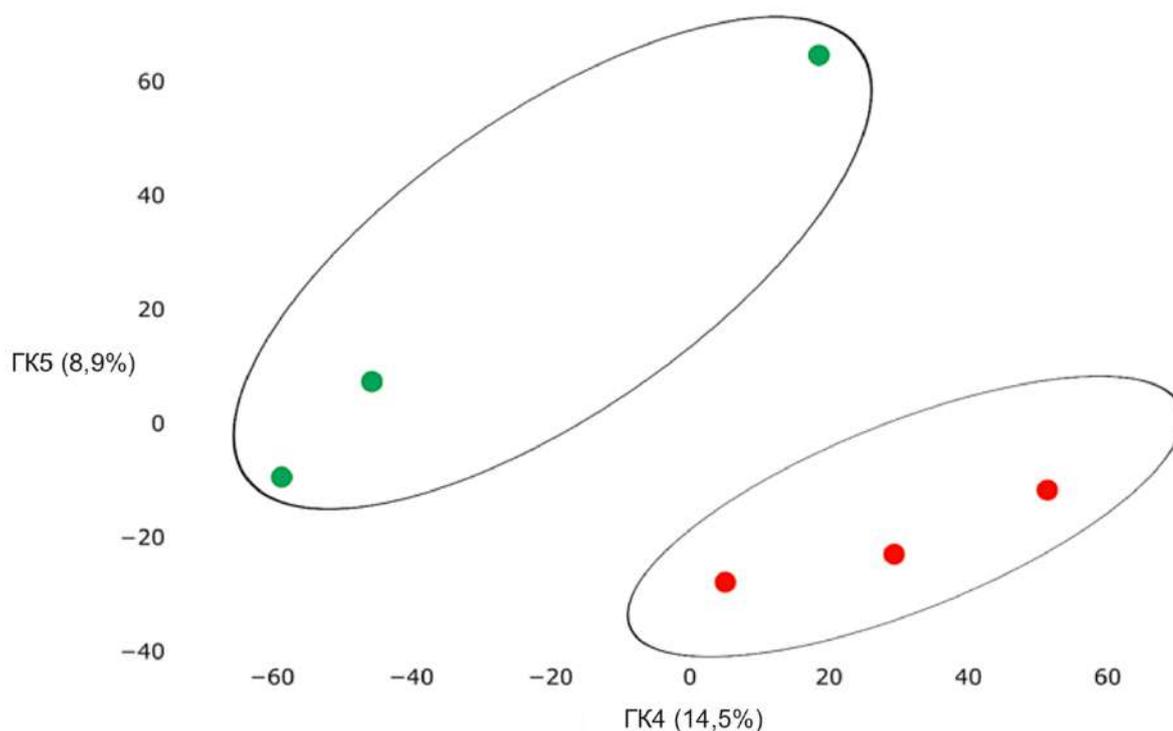


Рисунок 18. Анализ главных компонент (ГКА) показывает вариабельность экспрессии генов в здоровых (зеленые точки, $n = 3$) и постинфарктных (оранжевые точки, $n = 3$) МКСк с использованием веб-инструмента Phantasus. На главный компонент (ГК4) по оси X и ГК5 по оси Y приходится 14,5% и 8,9% общей изменчивости экспрессии генов, соответственно. Образцы визуально разделены на две основные группы [23].

Анализ данных секвенирования РНК выявил 13 дифференциально экспрессируемых генов ($\text{adj. } p\text{-value} < 0,05$) в полученных постинфарктных клеточных культурах. Среди активированных

генов можно отметить экспрессию *Spp1*, *RGD1565131*, *Tagap*, *Myh1*, тогда как экспрессия *Bmp3*, *Fgl2*, *Sfrp4*, наоборот, снижена в постинфарктных мезенхимных клетках сердца ($\log_2(\text{foldchange}) \geq 1.9$) (рисунок 19).

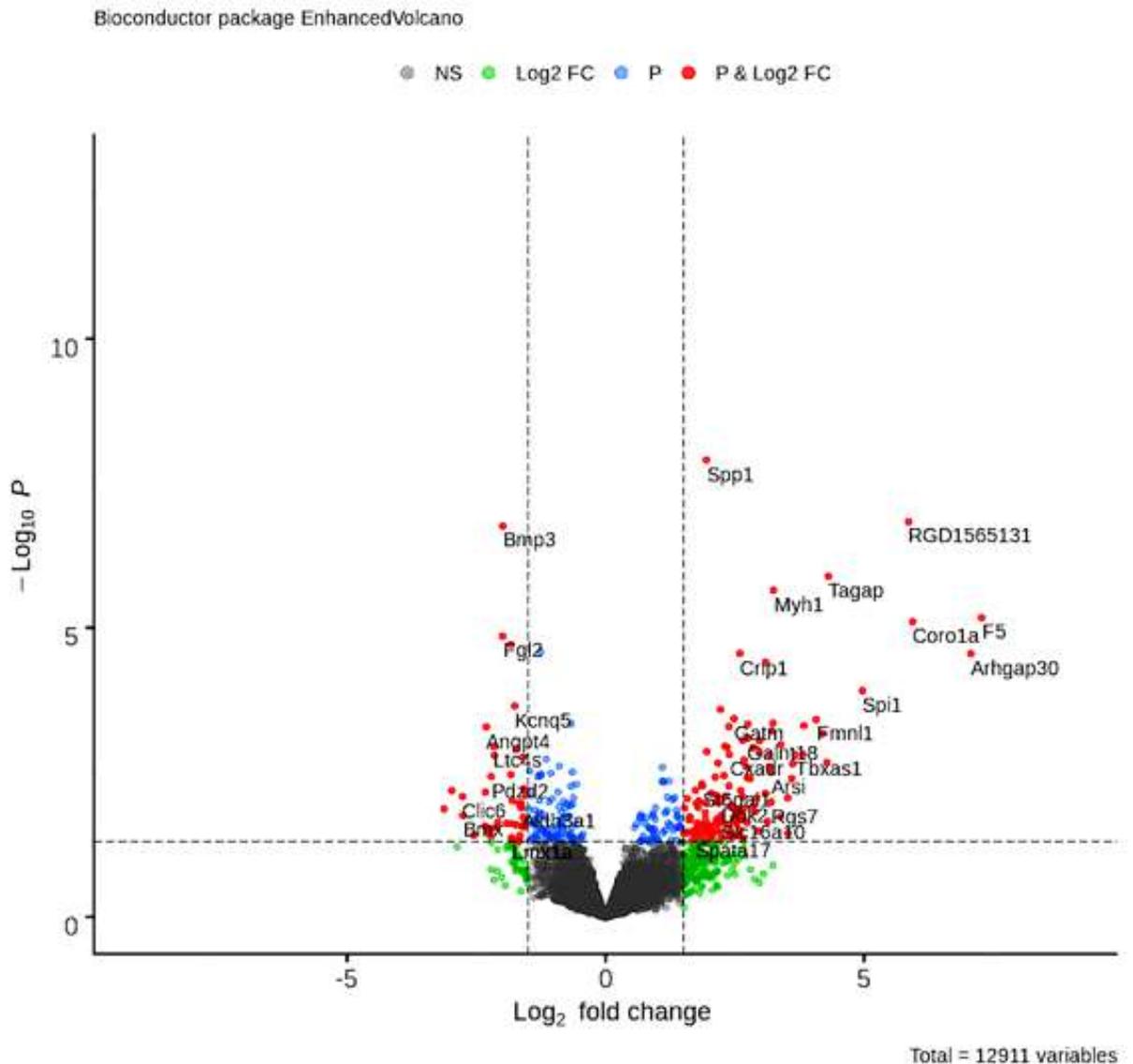


Рисунок 19. График Вулкан, показывающий дифференциально экспрессированные гены (adj. p-value < 0,05) в постинфарктных образцах по сравнению с контролем, выполненное с использованием программного обеспечения Bioconductor в R. Ось Y соответствует среднему значению экспрессии $-\log_{10}$ (значение p), а по оси X отображается значение $\log_2(\text{fold-change})$. Красные точки представляют собой дифференциально экспрессированные гены [23].

Полный список дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), отсортированных по значению adj. p-value представлен в таблице №6.

Ensembl ID	Ген	FDR-adjusted <i>p</i> -value	Log2 fold-change
ENSRNOG00000043451	<i>Spp1</i>	1.61 x 10 ⁻⁴	1.9501
ENSRNOG00000002381	<i>Bmp3</i>	7.42 x 10 ⁻⁴	-1.9863 ⁻
ENSRNOG00000025212	<i>RGD1565131</i>	7.42 x 10 ⁻⁴	5.8595
ENSRNOG00000018915	<i>Tagap</i>	4.12 x 10 ⁻³	4.3067
ENSRNOG00000049695	<i>Myh1</i>	5.74 x 10 ⁻³	3.2468
ENSRNOG00000057855	<i>F5</i>	1.42 x 10 ⁻²	7.2708
ENSRNOG00000019430	<i>Coro1a</i>	1.44 x 10 ⁻²	5.9357
ENSRNOG00000012881	<i>Fgl2</i>	2.23 x 10 ⁻²	-1.9900 ⁻
ENSRNOG00000054957	<i>Sfrp4</i>	2.79 x 10 ⁻²	-1.8279 ⁻
ENSRNOG00000004192	<i>Arhgap30</i>	2.99 x 10 ⁻²	7.0626
ENSRNOG00000016267	<i>Chst15</i>	2.99 x 10 ⁻²	-1.2591 ⁻
ENSRNOG00000027990	<i>Crip1</i>	2.99 x 10 ⁻²	2.5954
ENSRNOG00000030625	<i>Tf</i>	3.88 x 10 ⁻²	3.0969

Таблица 6. Полный перечень дифференциально экспрессируемых генов в постинфарктных мезенхимных клетках сердца [23].

Дополнительно, мы собрали 50 наиболее высоко экспрессируемых генов, отсортированных по статистическому критерию (таблица 7).

Ensembl ID	Ген	<i>p</i> -value	Log2 fold-change
ENSRNOG00000043451	<i>Spp1</i>	1,26E-08	1.9501
ENSRNOG00000025212	<i>RGD1565131</i>	1,47E-07	5.8595
ENSRNOG00000018915	<i>Tagap</i>	1,29E-06	4.3067
ENSRNOG00000049695	<i>Myh1</i>	2,24E-06	3.2468
ENSRNOG00000057855	<i>F5</i>	6,67E-06	7.2708
ENSRNOG00000019430	<i>Coro1a</i>	7,87E-06	5.9357
ENSRNOG00000027990	<i>Crip1</i>	2,77E-05	2.5954
ENSRNOG00000004192	<i>Arhgap30</i>	2,80E-05	7.0626
ENSRNOG00000030625	<i>Tf</i>	3,94E-05	3.0969
ENSRNOG00000012172	<i>Spi1</i>	1,23E-04	4.9652
ENSRNOG00000009273	<i>LOC259244</i>	1,61E-03	-2.1494 ⁻
ENSRNOG00000010529	<i>Thbs2</i>	1,23E-03	-1.7230 ⁻
ENSRNOG00000003244	<i>Ltc4s</i>	1,12E-03	-2.1610 ⁻
ENSRNOG00000005008	<i>Angpt4</i>	5,17E-04	-2.3083 ⁻
ENSRNOG00000020918	<i>Ccnd1</i>	4,54E-04	-0.66557 ⁻

ENSRNOG00000013781	<i>Kcnq5</i>	2,25E-04	-1.7575 ⁻
ENSRNOG00000016267	<i>Chst15</i>	2,61E-05	-1.2591 ⁻
ENSRNOG00000054957	<i>Sfrp4</i>	1,96E-05	-1.8279 ⁻
ENSRNOG00000012881	<i>Fgl2</i>	1,39E-05	-1.9900 ⁻
ENSRNOG00000002381	<i>Bmp3</i>	1,74E-07	-1.9863 ⁻
ENSRNOG00000012956	<i>Tgm2</i>	2,58E-04	2.2209
ENSRNOG00000000168	<i>Gatm</i>	3,75E-04	2.4814
ENSRNOG00000003207	<i>Fmnl1</i>	3,86E-04	4.0698
ENSRNOG00000057880	<i>Myh11</i>	4,47E-04	3.2359
ENSRNOG00000014294	<i>Ptpn6</i>	4,64E-04	2.7474
ENSRNOG00000004067	<i>Nrcam</i>	4,91E-04	3.8321
ENSRNOG00000050123	<i>Gdf5</i>	5,11E-04	2.3823
ENSRNOG00000003365	<i>Cadm3</i>	6,10E-04	3.2075
ENSRNOG00000006324	<i>Trpc6</i>	6,68E-04	4.2013
ENSRNOG00000017021	<i>Galnt18</i>	8,10E-04	2.7438
ENSRNOG00000013140	<i>Pdzd2</i>	3,74E-03	-2.2145 ⁻
ENSRNOG00000004110	<i>Trib2</i>	3,66E-03	-1.2600 ⁻
ENSRNOG00000014137	<i>Fbln1</i>	3,46E-03	-1.8347 ⁻
ENSRNOG00000053766	<i>Ramp3</i>	3,37E-03	-1.2514 ⁻
ENSRNOG00000016687	<i>Ssc5d</i>	3,26E-03	-1.0617 ⁻
ENSRNOG00000010789	<i>Dusp7</i>	3,14E-03	-0.64020 ⁻
ENSRNOG00000043486	<i>Tnfrsf26</i>	3,02E-03	-1.4638 ⁻
ENSRNOG00000019955	<i>Ogdhl</i>	2,47E-03	-0.89841 ⁻
ENSRNOG00000046168	<i>Ppm1l</i>	1,87E-03	-1.1518 ⁻
ENSRNOG00000007947	<i>Fam13a</i>	1,73E-03	-1.6005 ⁻
ENSRNOG00000017020	<i>Inpp5d</i>	8,97E-04	2.9746
ENSRNOG00000006952	<i>Prex1</i>	1,05E-03	3.3868
ENSRNOG00000019662	<i>Tm6sf1</i>	1,12E-03	2.3036
ENSRNOG00000002273	<i>Naaa</i>	1,16E-03	2.3480
ENSRNOG00000032150	<i>Adcy2</i>	1,18E-03	2.8485
ENSRNOG00000007866	<i>Clec2dl1</i>	1,39E-03	1.9554
ENSRNOG00000009401	<i>Lmo2</i>	1,43E-03	2.9767
ENSRNOG00000001557	<i>Cxadr</i>	1,55E-03	2.3917
ENSRNOG00000055721	<i>Rnf128</i>	1,55E-03	3.8165
ENSRNOG00000026870	<i>Clic6</i>	8,29E-03	-2.7685 ⁻

Таблица 7. Полный список генов, активно экспрессирующихся в постинфарктных мезенхимных клетках сердца, отсортированный по статистическому критерию (P-value <0,05) [23].

Мы обнаружили, что экспрессия *Twist1* и генов-мишеней Notch - *Hey2* и *Ccnd1* снижена в постинфарктных мезенхимных клетках сердца. Кроме того, снизилась активность гена *Thbs2*, который может отвечать за ингибирование ангиогенеза, и *Dnm1*, участвующего в везикулярном транспорте ($p\text{-value} > 0,05$) (таблица 8).

Ensembl ID	Ген	<i>p</i> -value	Log2 fold-change
ENSRNOG00000020918	<i>Ccnd1</i>	4,54E-04	-0,66557
ENSRNOG00000010529	<i>Thbs2</i>	1,23E-03	-1,723
ENSRNOG00000033835	<i>Dnm1</i>	1,23E-02	-0,89893
ENSRNOG00000013364	<i>Hey2</i>	2,32E-02	-2,0844
ENSRNOG00000011101	<i>Twist1</i>	5,74E-02	-0,555

Таблица 8. Компоненты сигнального пути Notch, экспрессия которых была подавлена в постинфарктных МКСк [23].

Таким образом, нами было обнаружено, что профиль генной экспрессии ИМ-МКСк отличается от транскрипционного профиля ОЛ-МКСк, но активационный потенциал полученных культур из постинфарктного участка был сравнительно ниже, чем в постинфарктных тканях.

3.1.7 Анализ канонических сигнальных путей и ОНГА показали, что паттерн экспрессии генов, характерный для ишемизированного сердца, частично сохраняется в ИМ-МКСк

Чтобы идентифицировать обогащенные сигнальные пути в полученном наборе данных, гены были загружены в Qiagen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) после фильтрации по значимости ($p\text{-value} < 0,05$). Всего было идентифицировано около 14 канонических сигнальных путей, в том числе метаболические и сигнальные пути, значимость которых превышала $-\log(P) > 1,3$, и только 1 сигнальный путь - STAT3 имел абсолютный z-score более 2.0 (рисунок 20).

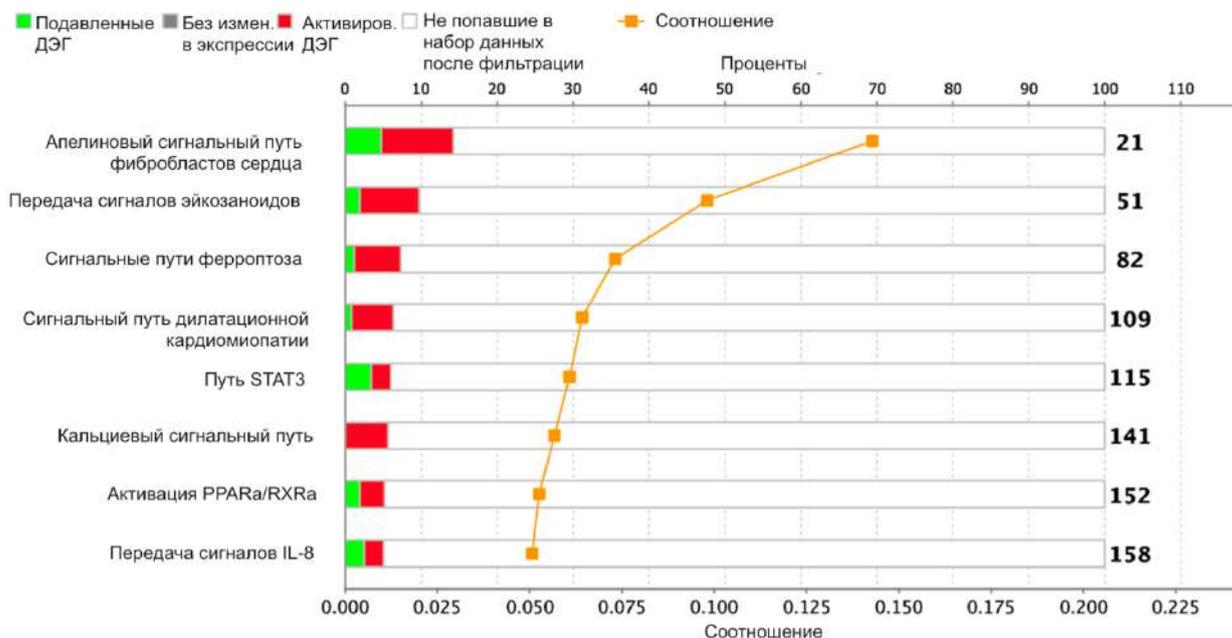


Рисунок 20. Нарушение регуляции сигнальных путей в постинфарктных МКСк, выявленное с помощью анализа IPA. Рисунок отражает дерегулируемые канонические сигнальные пути в виде гистограммы с накоплением по значению p-value, полученное методом точного критерия Фишера (p -значение <0.05 , z -score > 1). График отношения показывает количество значимых генов, выраженных в наборе данных, по сравнению с общим количеством генов в этом конкретном сигнальном пути [23].

Среди дерегулируемых сигнальных путей стоит отметить, что в ИМ-МКСк происходит aberrantная передача сигналов, характерная для постинфарктных процессов в ишемизированном сердце, включая нарушения клеточного метаболизма, воспаления и клеточной смерти. Полный перечень значимых сигнальных путей отражён в виде **таблицы №9**.

Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$	Соотношение	$z\text{-score}$	Подавленные ДЭГ	Без изменения в экспрессии	Активированные ДЭГ	Не попавшие в набор данных после фильтрации	Молекулы
Деградация путресцина III	1,6	0,2		1/10 (10%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	8/10 (80%)	<i>Aldh3a1, Maob</i>
Деградация триптофана X (млекопитающие,	1,38	0,154		1/13 (8%)	0/13 (0%)	1/13 (8%)	11/13 (85%)	<i>Aldh3a1, Maob</i>

посредством триптамина)								
Дегградация этанола IV	1,38	0,154		2/13 (15%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	11/13 (85%)	<i>Acss2,Aldh3a1</i>
Дегградация этанола II	1,32	0,143		2/14 (14%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)	12/14 (86%)	<i>Acss2,Aldh3a1</i>
Апелиновый сигнальный путь фибробласто в сердца	1,81	0,143		1/21 (5%)	0/21 (0%)	2/21 (10%)	18/21 (86%)	<i>Apln,Prkaa2,Tgfb3</i>
Передача сигналов эйкозаноидов	2,04	0,098		1/51 (2%)	0/51 (0%)	4/51 (8%)	46/51 (90%)	<i>Alox15,Ltc4s,Pla2g12a,Pla2g7,Tbxas1</i>
Сигнальные пути ферроптоза	1,75	0,073 2	1,342	1/82 (1%)	0/82 (0%)	5/82 (6%)	76/82 (93%)	<i>Alox15,Fth1,Prkaa2,Rasds1,Slc38a1,Tf</i>
Сигнальный путь атеросклероза	1,53	0,065 2		2/92 (2%)	0/92 (0%)	4/92 (4%)	86/92 (93%)	<i>Alox15,Apoe,Illrn,Ill33,Pla2g12a,Pla2g7</i>
Сигнальный путь дилатационной кардиомиопатии	1,68	0,064 2	-1,633	1/109 (1%)	0/109 (0%)	6/109 (6%)	102/109 (94%)	<i>Abcc9,Actg2,Adcy2,Cnn1,Myh11,Myl9,Tnnt2</i>
Путь STAT3	1,57	0,060 9	-2	4/115 (3%)	0/115 (0%)	3/115 (3%)	108/115 (94%)	<i>Flt4,Igf2r,Illr2,Illrl2,Ntrk2,Ptpn6,Rasd1</i>
Кальциевый сигнальный путь	1,57	0,056 7		0/141 (0%)	0/141 (0%)	8/141 (6%)	133/141 (94%)	<i>Atp2b4,Casq2,Hdac11,Myh11,Myl9,Tnnt2,Tpm1,Trpc6</i>
Активация PPAR α /RXR α	1,4	0,052 6	0	3/152 (2%)	0/152 (0%)	5/152 (3%)	144/152 (95%)	<i>Adcy2,Cyp2c9,Illr2,Illrl2,Plcd4,Prkaa2,Rasd1,Tgfb3</i>
Передача сигналов IL-8	1,32	0,050 6	0	4/158 (3%)	0/158 (0%)	4/158 (3%)	150/158 (95%)	<i>Arrb2,Ccnd1,Flt4,Gnat2,Mmp2,Myl9,Rasd1,Rhov</i>

Таблица 9. Полный перечень канонических и метаболических сигнальных путей с выраженными генами, полученный с помощью программы IPA [23].

Для поиска дерегулируемых биологических функций и заболеваний, ассоциированных с полученным набором генов, мы провели анализ в программе IPA и выявили около 12 категорий, с которыми были связаны обнаруженные ДЭГ (p -value – 0.05), и только в 3 затронутых процессах z -score был больше 2. Интересно отметить, что активность части генов, связанных с сердечной недостаточностью, сохраняется в постинфарктных клетках («сердечная недостаточность», p -

value = 8.25E-03, z-score = 2.177), и наряду с этим, продолжается модуляция процессов, связанных с неоваскуляризацией и миграцией клеток. В то же время был подавлен «клеточный рост» (p-value = 6.09E-03, z-score = -2.219), что может быть результатом задержки клеточного цикла, так как «синтез ДНК» также был снижен (p-value = 1.31E-02, z-score = 1.077). Остальные процессы, которые были затронуты в ИМ-МКСк, отражены в **таблице №10**.

© 2000–2021 QIAGEN. All rights reserved.		
Категории	p-value	Молекулы
Сердечно-сосудистые заболевания	4.12E-06–2.54E-02	<i>ABCC9, ACE, ACSS2, ACTA2, ADRA2B, AGT, ALOX15, APLN, APOE, ARRB2, ATP2B4, BMX, CIQTNF1, CASQ2, CCND1, CES1, CFD, CX3CL1, CXADR, DCBLD2, F5, FABP4, FBLN1, FCGR2A, FGF10, FLII, FLT3, FLT4, FMO3, GSN, HEY2, HSD11B1, IGF2R, IL1RN, IL33, INHA, INPP5D, let-7, LMO2, MMP2, MYH11, NOX1, OSMR, PLAU, PRKAA2, RGS2, SCG5, SEMA3A, SFRP4, SMTN, SNAI2, SPII, SPPI, TAGLN, TF, TGFB3, TGM2, THBS2, TNNT2, TRIM72, TRPC6, UNC13D, USP18, VAV1, XIRP1</i>
Передача сигналов и взаимодействие между клетками	1.86E-05–2.54E-02	<i>AGT, APOE, CCND1, COLEC12, CX3CL1, ECM1, FCGR2A, FGF10, FGF9, FLT3, GJA4, GSN, IGF2R, IL33, INPP5D, MMP2, MRC2, MYH11, MYO7A, NEDD9, PCSK5, PLAU, PTPN6, SIGIRR, SPII, SPPI, TGM2, THBS2, TNNT2, UNC13D, VAV1, WNT5B</i>
Клеточное движение	3.08E-05–2.54E-02	<i>AGT, APOE, ARRB2, ATP2B4, BMX, CCND1, CFD, CNTF, CORO1A, CX3CL1, ECM1, FABP4, FBLN5, FGF10, FGF9, FGL2, GDF5, GSN, IGF2R, IGFBP5, IL1RN, IL33, INPP5D, LGALS9B, LIMA1, LMX1A, LPAR1, LPXN, MMP2, MRC2, MYO7A, NEDD9, NOX1, NRCAM, NTRK2, PCSK5, PLA2G7, PLAU, PLXNA4, PRKAA2, PTPN6, RAMP3, SATB1, SEMA3A, SFRP4, SNAI2, SPII, SPPI, SPRY4, ST6GAL1, TGM2, THBS2, Tpm1, TWIST1, VAV1</i>
Передача сигналов	4.31E-04–2.54E-02	<i>ADRA2B, AGT, APLN, APOE, ATP2B4, CIQTNF1, CASQ2, CNTF, CX3CL1, DOK2, ECM1, FABP4, FGF10, FGF9, FLT3, GDF5, GLI2, GPR39, GSN, INPP5D, LGALS9B, LPAR1, MYH11, NOX1, NTRK2, PLAU, PLCD4, PRKAA2, PTPN6, RASSF2, RGS2, SCG2, SFRP4, SIGIRR, SPPI, TGFB3, TGM2, Tpm1, TRPC6, VAV1</i>
Клеточная морфология	6.43E-04–2.54E-02	<i>AGT, ALOX15, ARRB2, BMX, CASQ2, CCND1, CXADR, DUSP4, ECM1, FERMT3, GSN, HEXB, HEY2, IL33, INPP5D, LPAR1, NOX1, PLAU, PRKAA2, PRSS12, RGS2, SPPI, STC1, THBS2, TNNT2, Tpm1, TRIM72, TRPC6, USP18</i>
Устройство и организация клеток	8.25E-04–2.54E-02	<i>AGT, ALOX15, APOE, ARRB2, CCND1, CORO1A, FGF9, GPR39, GSN, HSD11B1, LIMA1, LPAR1, MMP2, MYL9, MYO7A, NEFH, PLAU, PRKAA2, SPII, STC1, Tpm1, UNC13D, VAV1</i>
Клеточное функционирование и	8.25E-04–	<i>ABCC9, AGT, ALOX15, APLN, APOE, ARRB2, ATP1A3, ATP2B4, B4GALNT1, BCL11B, CASQ2, CCND1, COLEC12, CORO1A, DUSP4, FABP4, FCGR2A, FGF9, FLII, FMO5, GNAT2, GPR39, GSN, HEXB, HEY2, HSD11B1, IGFBP5,</i>

поддержани е	2.54E-02	<i>IL1RN,IL33,INHA,INPP5D,MAFB,MRC2,MYH11,MYO7A,NFIL3,PLAU,PRKAA2,PTPN6,SATB1,SCG5,SFRP4,SPI1,SPP1,STC1,TBXAS1,TF,TGFB3,TGM2,TRPC6,UNC13D,VAV1,XIRP1</i>
Клеточная смерть и выживание	8.92E-04– 2.54E-02	<i>ABCC9,ACE,ACSS2,AGT,APOE,ARRB2,ATP2B4,B4GALNT1,BCL11B,BMX,C1QTNF1,CASQ2,CCDC88B,CCND1,CES1,CNTF,CRIP1,CXADR,DUSP4,EGR2,EPHX1,F5,FCGR2A,FGF10,FLI1,FLT3,FLT4,FTH1,GLI2,GSN,HEXB,HOXB4,IGF2R,IGFBP5,IL1RN,IL33,INPP5D,let-7,LPAR1,MMP2,NOG,NOX1,NTRK2,PLAU,PRKAA2,PTPN6,RASSF2,SEMA3A,SNAI2,SPI1,SPP1,STC1,TGFB3,TGM2,THBS2,TNNT2,TWIST1,USP18,VAV1</i>
Клеточное развитие	1.54E-03– 2.54E-02	<i>AGT,BCL11B,BMX,CCND1,CFD,CNTF,ECM1,EGR2,FBLN5,FGF10,FLI1,FLT3,FTH1,GSN,HEY2,HOXB3,HOXB4,IL1RN,IL33,INHA,INPP5D,let-7,LIMA1,LMX1A,MMP2,NAB2,NFIL3,NOG,NRCAM,NTRK2,PTPN6,RASD1,SATB1,SEMA3A,SFRP4,SNAI2,SPARCL1,SPI1,SPP1,STC1,TGFB3,TGM2,USP18</i>
Клеточный рост и пролиферац ия	1.54E-03– 2.54E-02	<i>ADCY2,B4GALNT1,BCL11B,BMX,CCND1,CNTF,DOK2,DUSP4,ECM1,EGR2,FBLN5,FLI1,FLT3,GSN,HOXB3,HOXB4,IL1RN,IL33,INHA,INPP5D,let-7,LIMA1,LYL1,MAFB,MMP2,NFIL3,NOG,NRCAM,NTRK2,PTPN6,RASD1,SATB1,SEMA3A,SFRP4,SPARCL1,SPI1,SPP1,STC1,TF,TGFB3,USP18</i>
Метаболизм витаминов и минералов	3.6E-03– 2.54E-02	<i>AGT,APLN,APOE,ATP2B4,CASQ2,FABP4,GSN,HSD11B1,INPP5D,MYH11,PLAU,PLCD4,PRKAA2,RGS2,SPP1,TGM2,TRPC6,VAV1</i>
Обмен углеводов	5.23E-03– 2.54E-02	<i>ABCC9,APLN,APOE,CCND1,CES1,CNTF,DLGAP3,FABP4,FCGR2A,FMO3,FMO5,GPR39,HEXB,HSD11B1,IGFBP5,IL33,INPP5D,SCG5,SPP1</i>
Репликация, рекомбинац ия и репарация ДНК	1.31E-02– 1.31E-02	<i>ADCY2,AFAP1L2,AGT,ARRB2,CCND1,FBLN5,FGF9,INHA,MMP2,SPP1</i>

Таблица 10. Топ биологических функций и заболеваний в постинфарктных клетках, выявленных с помощью IPA Software [23].

Мы построили вероятностные дерегулируемые сети генов с помощью программы IPA на основе обнаруженных активированных/подавленных генов и тех, которые были статистически отфильтрованы, но присутствуют в наборе данных (**таблица 11**).

№	Общее количество молекул в сети	Оцен ка	Количе ство молеку л в фокусе	Топ биологических функций и заболеваний, ассоциированных с набором молекул
1	ACTA2, AFAP1L2, Akt, ALOX15, APLN, APOE, ARRB2, CNN1, CNTF, DUSP7, EGR2, ERK, ERK1/2, FABP4, Fam13a, FBLN5, GLI2, Gsk3, IGF2R, Jnk, MIR143-145a, MMP2, NFkB (complex), NOX1, PI3K (complex), Pkc(s), PLAU, PRKAA2, PTPN6, RGS2, ROCK, TAGLN, TGM2, THBS2, TWIST1	32	25	Сердечно-сосудистые заболевания, Развитие и функционирование сердечно-сосудистой системы, Развитие и функционирование скелетной и мышечной системы
2	ADGRG1, BCL11B, CSF3, DAPP1, DMD, ERG, ESR2, FGF9, FLI1, GATA1, GATA2, GF11B, HEY2, HOXA3, ID2, IKZF4, IRF8, ITGAM, LMO2, LMX1A, LYL1, MAOB, Meis1, mir-8, MSX2, MYH1, PKM, PPP4R3A, Pri8a2, PROM1, RUNX1, SCX, SPI1, TAL1, ZFPM1	10	12	Клеточное развитие, клеточный рост и пролиферация, экспрессия генов
3	ADCY2, AGT, AKAP12, AMPK, ANXA8/ANXA8L1, BAX, BDNF, C2, CFD, COL1A1, DNMT3B, EIF2AK2, EP300, EPHX1, ESM1, GSN, HES1, IFNB1, IGF1, IGF2, MAPK1, MAPK3, Mek, mir-34, MMP2, NFE2L2, NOTCH1, NRAS, NTRK2, PRKCE, RYR2, SIRT1, STC1, TP53, XIRP1	10	12	Рак, клеточная смерть и выживание, повреждения организма и патологии

Таблица 11. Вероятностные сети дерегулируемых генов, построенных с помощью программы IPA на основе обнаруженных активированных/подавленных генов и тех, которые были статистически отфильтрованы, но присутствуют в наборе данных [23].

Среди биологических функций и заболеваний, ассоциированных со значимыми ДЭГ из отфильтрованного набора генов, встречаются процессы, связанные с развитием и патологиями сердечно-сосудистой системы. Одним из ключевых генов-регуляторов в полученном наборе данных являлся *Hey2*, который является геном-мишенью Notch, и его экспрессия была изменена в ИМ-МКСк.

Для подтверждения результатов секвенирования РНК и оценки уровня экспрессии сигнальных компонентов Notch методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией были использованы МКСк 1–3 пассажей, полученные из тканей крыс через 8 и 24 ч после индукции инфаркта миокарда. В частности, мы оценили уровень экспрессии *Vmp2* и *Runx2*, дерегуляция которых была выявлена в транскриптом. Поскольку сигнальный путь BMP играет существенную роль в кардиогенезе, как и сигнальный путь Notch, а *Runx2* может быть геном-

мишенью для обоих типов передачи сигналов и тоже ассоциирован с развитием сердца, то согласно нашей гипотезе, *Bmp2* и *Runx2* могут являться генами раннего ремоделирования. Нами установлено (рисунок 21), что в постинфарктных мезенхимных клетках сердца частично сохраняется активационный потенциал, который выражается в повышенной экспрессии генов *Bmp2* и *Runx2*, а также генов *Jag1* и *Hes1* сигнального пути Notch по сравнению с клетками, полученными из здорового миокарда ложнопериованных крыс.

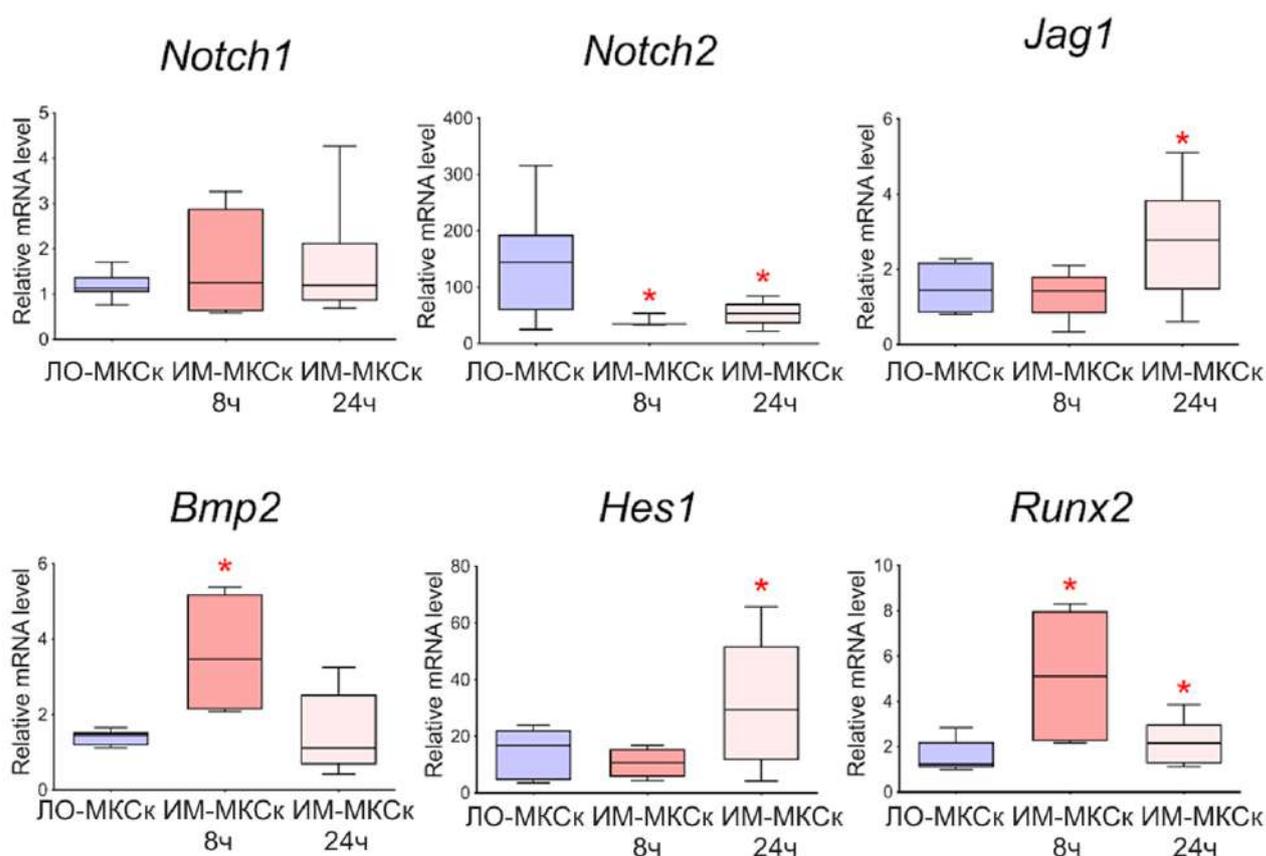


Рисунок 21. Динамика экспрессии компонентов сигнального пути Notch и генов *Bmp2/Runx2* в мезенхимных клетках сердца с использованием количественного ПЦР-анализа. ЛО-МКСк - клетки здорового миокарда от ложнопериованных крыс ($n = 3$), ИМ-МКСк 8ч - постинфарктные клетки крыс через 8 ч после индукции инфаркта ($n = 4$), ИМ-МКСк 24ч - постинфарктные клетки крыс через 24 часа после индукции инфаркта ($n = 9$). По вертикали - относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta CT}$; Представлены диаграммы с усами со значениями от минимума до максимума. Звездочкой показаны достоверные различия между группами ЛО-МКСк и ИМ-МКСк при $p < 0,05$ (непарный непараметрический критерий Манна-Уитни) [23].

Таким образом, мы показали, что ИМ-МКСк частично сохраняется активационный транскрипционный профиль, характерный для ишемизированной ткани, и экспрессия компонентов Notch и *Bmp2/Runx2* также изменена в постинфарктных МКСк.

3.1.8 Активация компонентов сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2* в мезенхимных клетках сердца при индукции гипоксии *in vitro*

Чтобы определить, является ли гипоксия достаточным фактором для активации сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2* в МКСк, мы взяли клетки из здорового миокарда ложнооперированных крыс и индуцировали гипоксию *in vitro*. ЛО-МКСк находились в условиях гипоксического стресса в течение 8 и 24 часов с концентрациями кислорода либо 1%, либо 5%. Мы показали (рисунок 22), что в условиях гипоксии компоненты сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2* активируются в клетках по сравнению с ЛО-МКСк в условиях нормоксии. *Hif-1a* и *Vegfa* использовались в качестве маркера гипоксии.

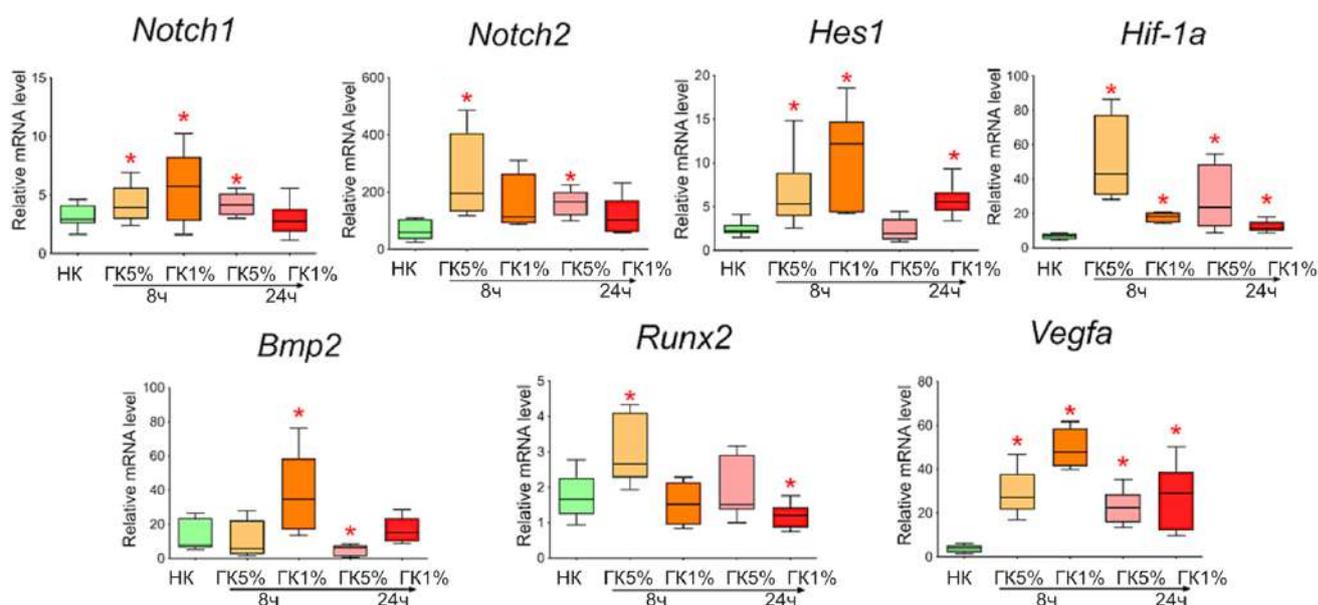


Рисунок 22. Динамика экспрессии компонентов сигнального пути Notch, факторов *Bmp2/Runx2* и маркеров гипоксического стресса в мезенхимных клетках сердца, полученных из здорового миокарда ложнооперированных крыс с помощью количественного ПЦР-анализа. НК - здоровые клетки в состоянии нормоксии ($n = 3$), GK5% - здоровые клетки в состоянии гипоксии с уровнем кислорода 5% ($n = 3$), GK1% - здоровые клетки в состоянии гипоксии с уровнем кислорода 1% ($n = 3$). По горизонтали – время, в которое клетки находились в условиях гипоксии. По вертикали — относительное количество мРНК, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta CT}$; Представлены диаграммы с усами от минимума до максимума. Звёздочка показывает значительные различия между контролем и группами GK5% и GK1% при $p < 0,05$ (непарный непараметрический критерий Манна-Уитни) [23].

Таким образом, нами было отмечено, что гипоксия может являться фактором активации мезенхимных клеток сердца, и способствовать повышению экспрессии компонентов сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2*.

3.1.9 Экзогенная активация сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца дозозависимо активирует *Runx2*

Чтобы выявить взаимосвязь между сигнальным путем Notch и факторами *Bmp2* и *Runx2*, мы взяли МКСк из здорового миокарда ложнооперированных крыс и трансдуцировали их лентивирусным вектором, несущим вставку NICD, для активации сигнального пути Notch. Вирусные частицы добавляли в культуру в двух различных концентрациях: 3 мкл и 15 мкл. Клетки культивировали с вирусом в течение 24 часов. Мы продемонстрировали (**рисунок 23**), что активация сигнального пути Notch приводит к дозозависимой активации *Runx2*. Напротив, *Bmp2* не реагировал на активацию Notch.

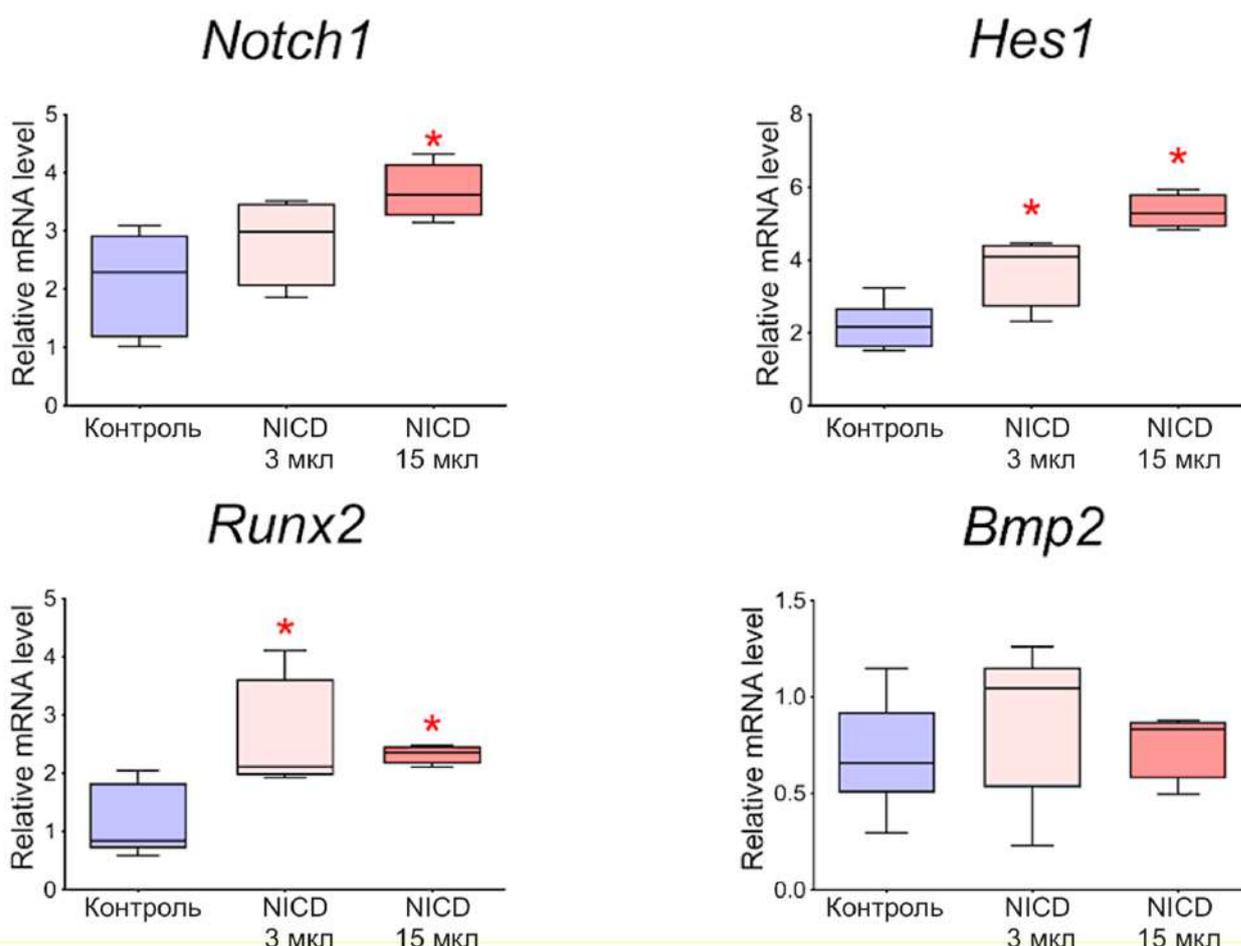


Рисунок 23. Динамика экспрессии факторов *Bmp2/Runx2* и компонентов сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца, полученных из здорового миокарда ложнооперированных крыс методом количественного ПЦР-анализа. Контроль – здоровые клетки в качестве отрицательного контроля ($n = 3$), NICD 3 мкл – здоровые клетки, к которым было добавлено 3 мкл вируса с NICD ($n = 3$), NICD 15 мкл – здоровые клетки, к которым было добавлено 15 мкл вируса с NICD ($n = 3$). По вертикали - относительное количество мРНК, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta CT}$; Представлены диаграммы с усами от минимума до максимума. Звёздочка показывает значительные различия между Контроль и группами NICD (3 мкл) и NICD (15 мкл) при $p < 0,05$ (непарный непараметрический критерий Манна-Уитни) [23].

3.1.10 Обсуждение результатов по изучению механизмов активации регенеративного потенциала мезенхимных клеток сердца

Инфаркт миокарда — распространенное острое заболевание, при котором нарушается работа сердца. Молекулярно-клеточные механизмы раннего ремоделирования сердца и восстановления постинфарктного миокарда остаются до конца не изученными. В ряде исследований было неоднократно отмечено, что в периинфарктной зоне формируются очаги пролиферативной активности в ответ на повреждение [162, 163]. Влияние гипоксемии на восстановление миокарда после повреждения также отмечено и в эксперименте *in vivo* на мышах [22]. Данное исследование было направлено на изучение ранних транскрипционных событий в ткани сердца после инфаркта миокарда и изучение клеточной популяции МКСк, которые могли быть выделены из ткани миокарда для анализа молекулярных механизмов активации регенеративного потенциала этих клеток.

Для этого мы индуцировали инфаркт миокарда у крыс для изучения ранних транскрипционных событий, происходящих через 8 и 24 часа после хирургических процедур. Результаты секвенирования РНК показали значительные изменения паттерна экспрессии генов в постинфарктной ткани. Было затронуто множество сигнальных путей и процессов, связанных с ранним ремоделированием сердца, пролиферацией и миграцией клеток, а также иммунным ответом. Последнее сейчас является предметом активного обсуждения, в ходе которого исследователи пришли к пониманию важности иммунного ответа на первичном этапе развития инфаркта миокарда [164].

В ряде работ было показано, что экспрессия некоторых компонентов сигнального пути Notch повышалась в клетках сердца при инфаркте миокарда [165-168]. Передача сигналов Notch представляет собой высококонсервативный сигнальный путь, участвующий в эмбриональном развитии большинства многоклеточных организмов, а также в регуляции тканевого гомеостаза, клеточной дифференцировки и поддержании популяции стволовых клеток в постнатальном периоде [169, 170]. Однако, роль Notch в восстановлении миокарда до конца не изучена [171-173].

Мы наблюдали, что компоненты сигнального пути Notch активируются в постинфарктной ткани. Причём часть из них являлась сверхэкспрессированными генами-мишенями, относящимися к неканоническим формам сигнального пути Notch, таких как *Myc*, *Ccnd1* и *Runx2* [151]. Фактор транскрипции *Runx2* ранее был отмечен в развитии сердечно-сосудистой системы [174]. В том числе, участие в развитии принимает сигнальный путь BMP [175], и, по нашим данным [23], он реактивируется при инфаркте миокарда, в частности, *Bmp2*. Известно, что он играет критическую роль в развитии сердца, в индукции дифференцировки клеток-предшественников сердца в кардиомиоциты и их стимуляции к сокращению [176, 177]. Он может

играть ключевую роль в регуляции и модуляции сигнального пути Notch [178], и участвовать в процессах раннего ремоделирования [179]. Экспрессия *Vmp2* наблюдалась как в кардиомиоцитах, так и в интерстициальных фибробластах при инфаркте миокарда [180]; однако механизм активации также остается неизвестным [129]. Мы предполагаем, что сигнальный путь Notch вместе с ключевыми факторами *Vmp2* и *Runx2* может играть важную роль в ранних миокардиальных событиях в ответ на повреждение (**Рисунок 24**).

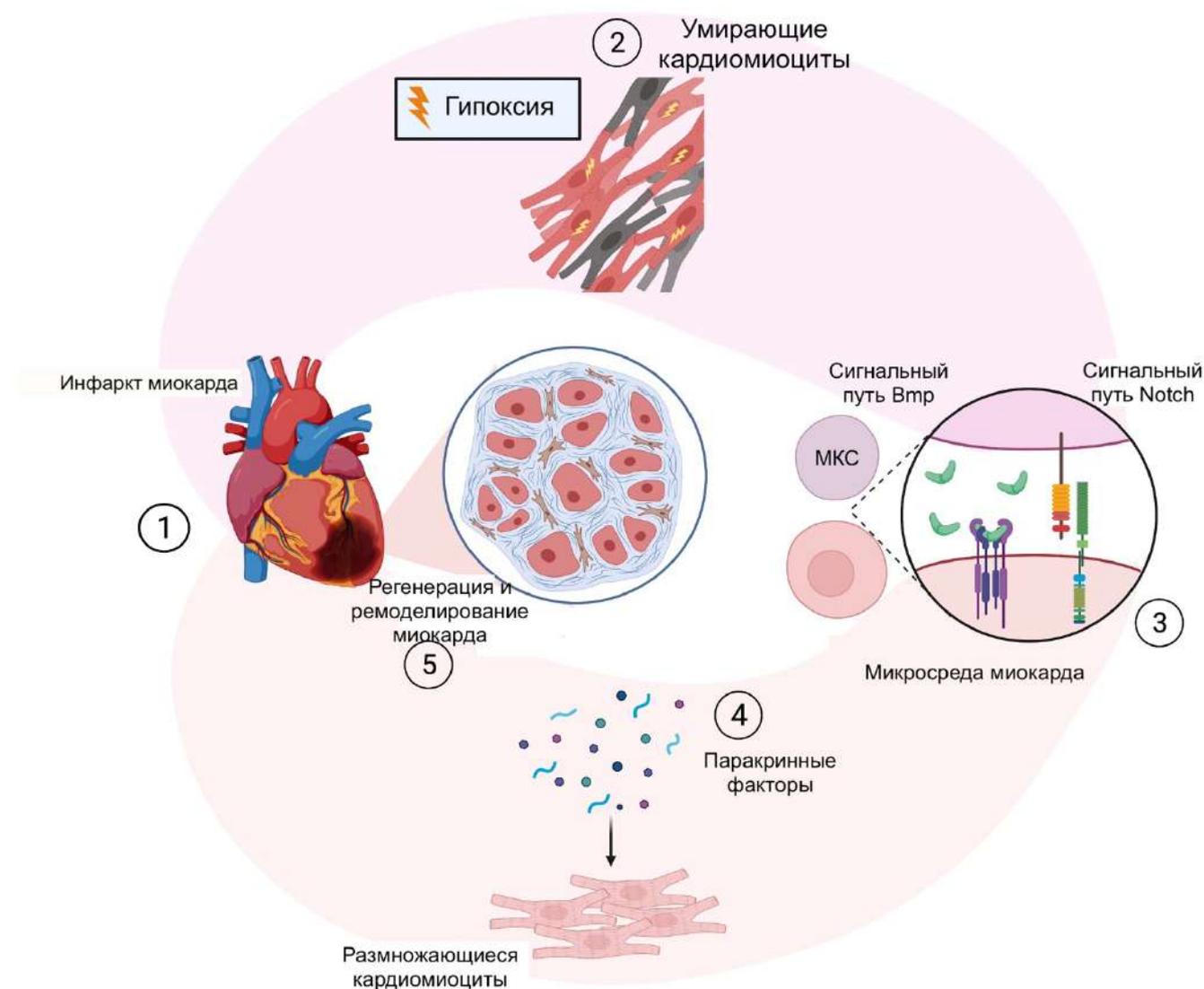


Рисунок 24. Графическое представление о возможном взаимодействии сигнального пути Notch и Vmp в процессах раннего ремоделирования миокарда после инфаркта [23].

Для подтверждения этого нами была получена фракция активированных мезенхимных клеток сердца из постинфарктного участка миокарда. Мы выделяли клетки через 24 часа после индукции инфаркта миокарда, и в процессе культивирования их пассировали всего три раза для сохранения их свойств и проведения функциональных тестов. Мы наблюдали выраженную

пролиферативную и миграционную активность постинфарктных МКСк по сравнению с контрольной популяцией в ходе культивирования и проведения функциональных тестов. Известно, что МКСк способны к дифференцировке в кардиогенном, остеогенном и адипогенном направлениях [181, 182]. Мы также получили дифференцировку МКСк в трёх направлениях, которую наблюдали при помощи иммуоцитохимического окрашивания клеток. При оценке экспрессии специфических маркеров кардиогенной, остеогенной и адипогенной дифференцировки мы получили более высокий уровень активации клеток, происходящих из постинфарктной зоны в отличие от контрольной популяции, происходящей из здорового участка миокарда.

Пролиферативную активность оценивали в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence. Мы обнаружили, что постинфарктные мезенхимные клетки сердца обладают более выраженным пролиферативным потенциалом, чем МКСк, полученные из здорового сердца ложнооперированных крыс. Это согласуется с теми данными, которые мы получили на постинфарктных тканях, а также с литературными источниками [183], показывающими активность фибробластов при поражении и их взаимодействии с кардиомиоцитами. В свою очередь, мы провели секвенирование РНК первичных культур МКСк и обнаружили, что постинфарктные МКСк частично сохраняют свой транскрипционный профиль и отражают ранние события в поражённом миокарде.

Для сравнения мы получили фракцию активированных МКСк через 8 часов после индукции инфаркта миокарда. Последующий анализ оценки экспрессии компонентов сигнального пути Notch и предполагаемых генов раннего ремоделирования с использованием ПЦР в реальном времени показали, что ген-мишень Notch *Hes1* и факторы *Bmp2/Runx2* активируются. Причем активация последних была выражена именно в более ранний момент времени.

Гипоксия была описана как фактор, модулирующий сигнальный путь Notch [184], но оказывает ли влияние гипоксический стресс *in vitro* на схожую активацию компонентов сигнального пути Notch и генов раннего ремоделирования на здоровых МКСк, полученных от ложнооперированных крыс, остаётся неясным. Мы индуцировали гипоксию *in vitro*, поместив мезенхимные клетки сердца в инкубатор с возможностью регуляции уровня кислорода. МКСк испытывали острый гипоксический стресс при 1% или 5% уровнях кислорода в течение 24 часов. Мы выделили РНК и оценили экспрессию генов. Мы обнаружили, что гипоксия *in vitro* также увеличивает экспрессию компонентов сигнального пути Notch и генов *Bmp2/Runx2*.

В эмбриональном развитии существуют межмолекулярные взаимодействия между сигнальным путем Notch и *Bmp2/Runx2* [56, 185], но может ли Notch действовать как активатор предполагаемых факторов раннего ремоделирования в здоровых МКСк, остаётся неизвестным.

Мы трансдуцировали здоровые МКСк, полученные от ложнооперированных крыс, лентивирусным вектором в низкой и высокой дозе, содержащим вставку внутриклеточного домена Notch 1 (NICD1). Активация сигнального пути Notch оказала дозозависимое влияние на экспрессию *Runx2*. Однако, *Bmp2* не реагировал на введение вектора, что может свидетельствовать о его вышестоящей роли в регуляции данной генной сети.

Стоит отметить, что в проведённых исследованиях был ряд ограничений. Клетки, происходящие из эпикарда, могут способствовать неоваскуляризации и кардиомиогенезу через реактивацию фетальных генов при инфаркте миокарда [186-188]. Перед выделением РНК и выведением клеточных культур, эпикард был удалён, но возможно, что его влияние тем не менее могло быть оказано на миокард, поэтому потребуются дополнительные исследования для уточнения данного эффекта. Также следует отметить, что культивирование клеток *in vitro* может изменять их свойства, в том числе пролиферативные и проангиогенные [189]. В результатах данной исследования постинфарктные МКСк пролиферировали лучше, чем здоровые МКСк, но как это повлияет на регенерацию миокарда *in vivo*, нуждается в дальнейшем изучении.

3.2 Дерегуляция сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло

Принимая во внимание важность передачи сигналов Notch в развитии сердца и формировании специфического паттерна экспрессии генов, мы предположили, что путь Notch может быть ослаблен в клетках сердечной ткани пациентов с тетрадой Фалло (ТФ) ввиду гипоксического стресса [5], и это нарушение регуляции может быть связано с ремоделированием сердечной ткани у пациентов с ТФ. Сердечные клетки-предшественники или мезенхимные клетки сердца человека (МКСч), происходящие из тканей желудочков и предсердий, широко описаны для сердца человека и грызунов [190]. Они могут представлять собой удобный инструмент для раскрытия механизмов, связанных с развитием и болезнями сердца [191, 192]. Целью данного раздела работы являлась оценка активности сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца человека (МКСч), полученных из миокарда желудочков от пациентов с ТФ.

3.2.1 Мезенхимные клетки сердца от пациентов с тетрадой Фалло обладают альтернативным фенотипом

Из тканей миокарда, полученных от пациентов с тетрадой Фалло, были выделены

мезенхимные клетки сердца (ТФ-МКСч), которые были сравнены с мезенхимными клетками сердца пациентов с изолированным дефектом межжелудочковой перегородки (ДП-МКСч) в качестве контроля, так как не было отмечено влияние данной патологии на сигнальный путь Notch [193]. МКСч были фенотипированы с помощью проточной цитометрии. Для анализа использовали клетки 2–3 пассажей. Было продемонстрировано (**Рисунок 25**), что МКСч обладали мезенхимным фенотипом и умеренно экспрессировали CD117 (с-kit), характерным для этой линии [194].

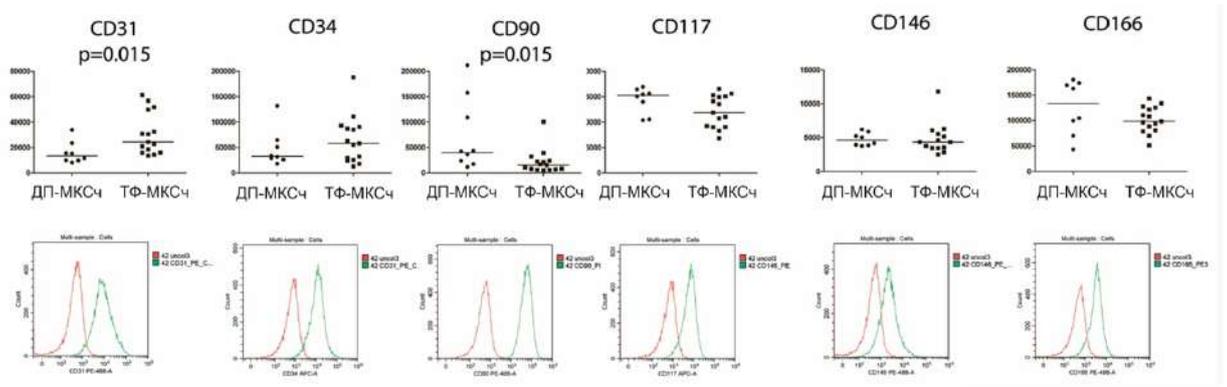


Рисунок 25. Уровни экспрессии генов-маркеров мезенхимных стволовых клеток в ТФ-МКСч и ДП-МКСч по данным проточной цитометрии. Экспрессия маркеров в типичной популяции МКСч указана на нижней панели. Верхняя панель показывает точечные графики для ТФ-МКСч и ДП-МКСч. Изоотипы (контроль) отмечены красной линией, а МКСч – зеленой. Точка - средняя флуоресценция для МКСч. Группы сравнивали непараметрическим критерием Манна-Уитни; линия - медиана; $p > 0,05$ не указано. ДП-МКСч: $n = 8$; ТФ-МКСч: $n = 15$; вертикальная ось - интенсивность флуоресценции [26].

ТФ-МКСч экспрессировали больше эндотелиального маркера CD31 (PECAM-1) и меньше мезенхимного маркера CD90, чем ДП-МКСч [27]. Таким образом, поверхностные маркеры ТФ-МКСч отличались от ДП-МКСч.

3.2.2 Экспрессия компонентов сигнального пути Notch изменена в ТФ-МКСч

Для того, чтобы оценить экспрессию ключевых генов сигнального пути Notch, мы выделили общую суммарную РНК из МКСч и провели ОТ-ПЦР с использованием геноспецифичных праймеров (**рисунок 26а**).

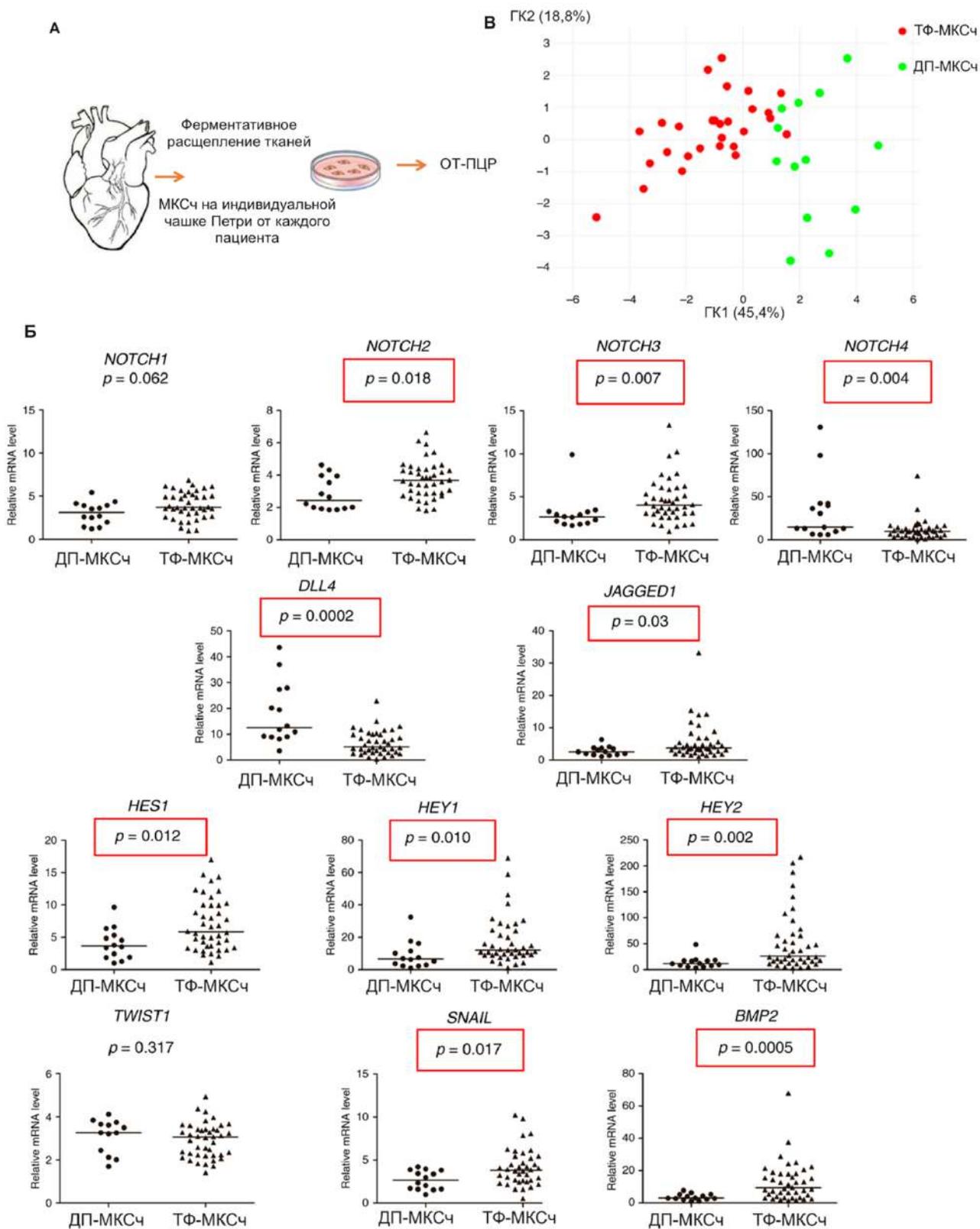


Рисунок 26. Оценка экспрессии компонентов сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло (ТФ-МКСЧ) и дефектом межжелудочковой перегородки (ДП-МКСЧ). **A.** Схема эксперимента. **Б.** Уровни мРНК оценивали с помощью количественной ПЦР и нормализовали по GAPDH. Вертикальная ось представляет относительное содержание мРНК. Группы сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; линия представляет медиану; $p < 0,05$ считался значимым (выделено красными квадратами). ДМЖП:

n = 14; ТФ: n = 42. Точка представляет собой среднее значение из количественной ПЦР, проведенной в двух повторностях для каждой отдельной культуры МКСч. **В.** Анализ главных компонент, показывающий различия между ТФ-МКСч и ДП-МКСч по профилям экспрессии генов [26].

Мы оценили экспрессию компонентов сигнального пути Notch, а именно рецепторов *NOTCH1–4*, лигандов *JAG1*, *DLL4* и генов-мишеней *HES1*, *HEY1*, *HEY2*, *TWIST* и *SNAIL* (**рисунок 266**). Поскольку *BMP2* был отмечен в кооперации со сигнальным путем Notch при формировании кардиального паттерна [195], то мы также оценили экспрессию гена *BMP2*. Нами было установлено, что экспрессия *NOTCH4* и *DLL4* была снижена в ТФ-МКСч в сравнении с клетками ДП-МКСч, тогда как экспрессия *NOTCH2*, *NOTCH3* и *JAG1*, так и экспрессия генов-мишеней Notch - *HES1*, *HEY1* и *HEY2* была увеличена. Экспрессия *BMP2* также повышалась в ТФ-МКСч.

Анализ главных компонент показал различие в паттерне экспрессии между ТФ-МКСч и ДП-МКСч, и ТФ-МКСч формировали отдельный кластер генной экспрессии (**рисунок 26в**). Вариативными переменными были данные по экспрессии генов, полученных с помощью ОТ-ПЦР и рассчитанных по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$, а именно: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *JAG1*, *DLL4*, *HEY1*, *HES1*, *HEY2*, *SNAIL*, *TWIST1* и *BMP2*. Таким образом, наши результаты показывают, что в ТФ-МКСч происходят изменения в базовой экспрессии компонентов сигнального пути Notch.

Ввиду высокой вариабельности экспрессии компонентов сигнального пути Notch в ТФ-МКСч, мы оценили корреляцию между генами-мишенями и рецепторами Notch (**рисунок 27**).

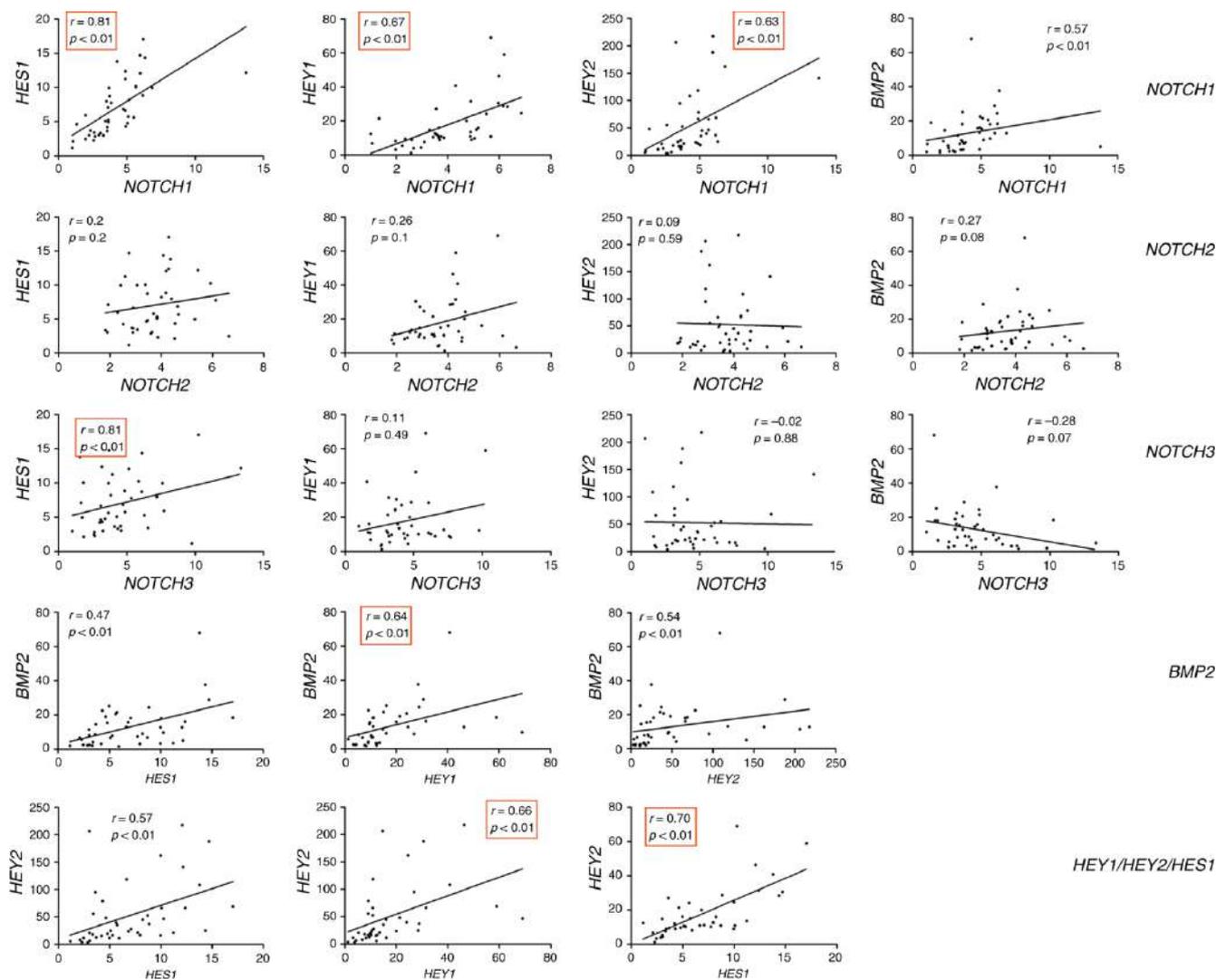


Рисунок 27. Графики рассеяния показывают корреляции между генами Notch (*NOTCH1,2,3*), *BMP2* и мишенями Notch (*HES1/HEY2/HES2*). r – коэффициент ранговой корреляции Спирмена; $p < 0,05$ считается значимым (выделено красными квадратами); $n = 42$ [26].

Мы обнаружили корреляцию между уровнями *NOTCH1* и мишенями *HES1*, *HEY1*, *HEY2*; уровень *NOTCH3* коррелировал с *HES1*. Это предполагает, что *NOTCH1* и *NOTCH3*, скорее всего, вносят вклад в повышение уровня экспрессии сигнального пути Notch, наблюдаемый посредством активации *HEY1*, *HEY2* и *HES1* в ТФ-МКСч. Мы наблюдали умеренную корреляцию между *HEY1* и *BMP2*, что может указывать на возможное взаимодействие в определении фенотипа ТФ-МКСч. Мы не обнаружили каких-либо ассоциаций с высокой/низкой передачей сигналов Notch ни с какими клиническими параметрами, ни с возрастом пациентов (данные не представлены).

3.2.3 Различия в паттерне экспрессии генов Notch в ТФ-МКСч, происходящих из правого предсердия и желудочка, незначительны

Чтобы проанализировать обнаруженные различия в генной экспрессии МКСч из разных камер сердца, мы выделили ТФ-МКСч из правого предсердия (ПП) и правого желудочка (ПЖ) от нескольких пациентов с ТФ и оценили экспрессию генов с помощью ОТ-ПЦР и ГКА (**рисунок 28**).

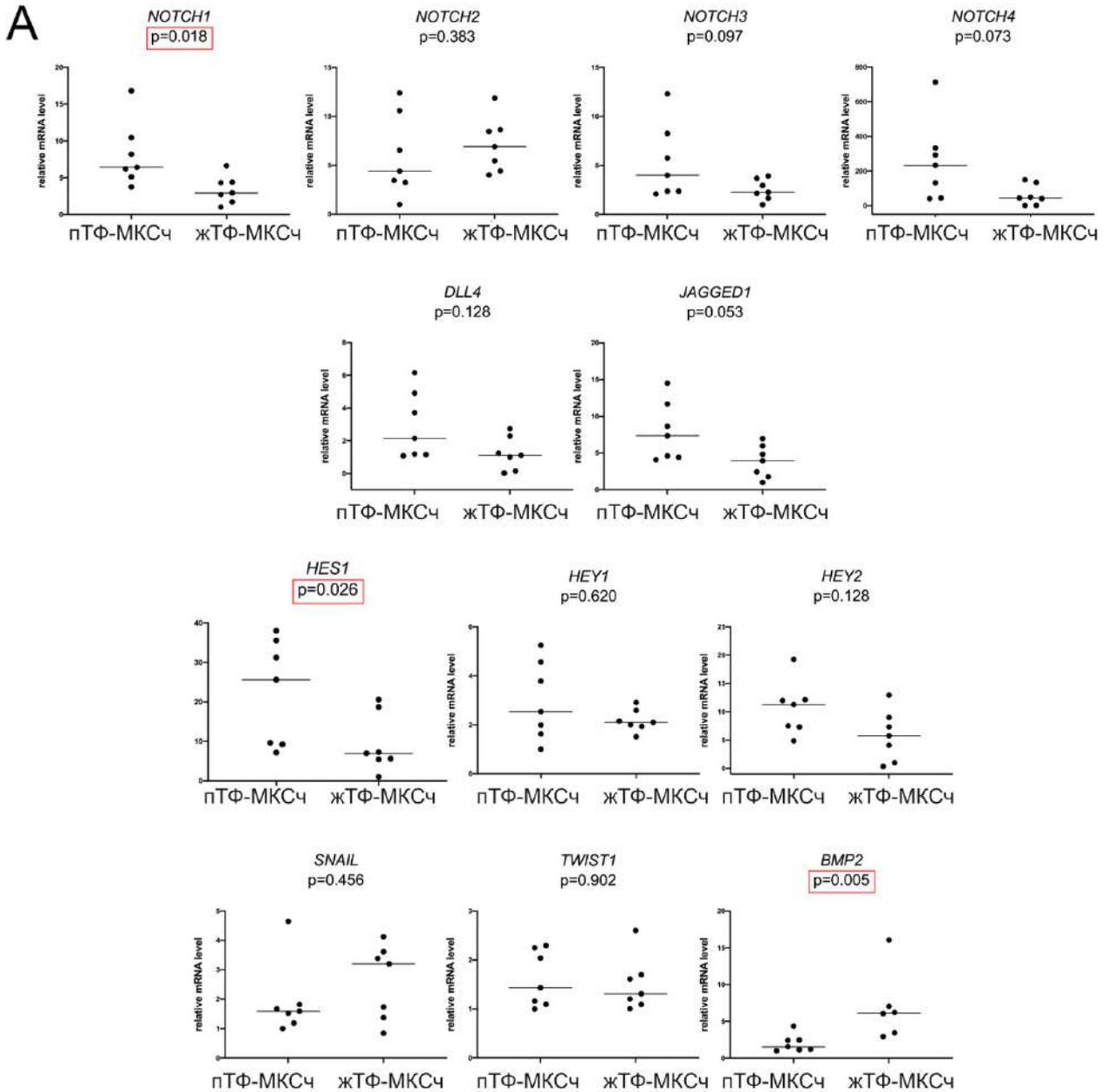
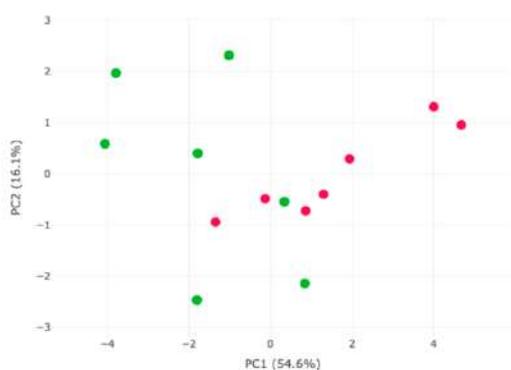
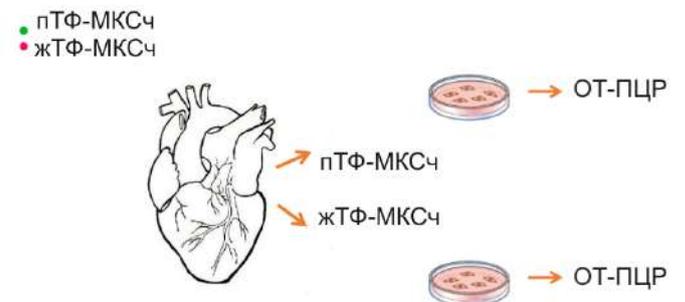
**Б****В**

Рисунок 28. Оценка экспрессии компонентов сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца от пациентов с ТФ (ТФ-МКСЧ) из двух источников: правого предсердия (пТФ-МКСЧ) и желудочка (жТФ-МКСЧ). А. Уровни мРНК оценивали с помощью количественной ПЦР и нормализовали по GAPDH. Вертикальная ось представляет относительное содержание мРНК.

Группы сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; линия представляет медиану; $p < 0,05$ считался значимым (выделено красными квадратами). ПП: $n = 7$; ПЖ: $n = 7$. Точка представляет собой среднее значение, полученное количественной ПЦР, и проведенное в двух повторностях для каждой отдельной культуры ТФ-МКСч. В. Анализ главных компонент, показывающий различия между ТФ-МКСч из ПЖ и ПП по профилям экспрессии генов. С. Схема эксперимента [26].

Мы не обнаружили существенных различий между ТФ-МКСч, происходящими из ПП и ПЖ, в особенности, по основным генам-мишеням сигнального пути Notch. Однако, различия в экспрессии Notch наблюдаются в тканях между ПЖ-ТФ и ПП-ТФ (**рисунок 29**), что может указывать на сложный клеточный состав ткани миокарда.

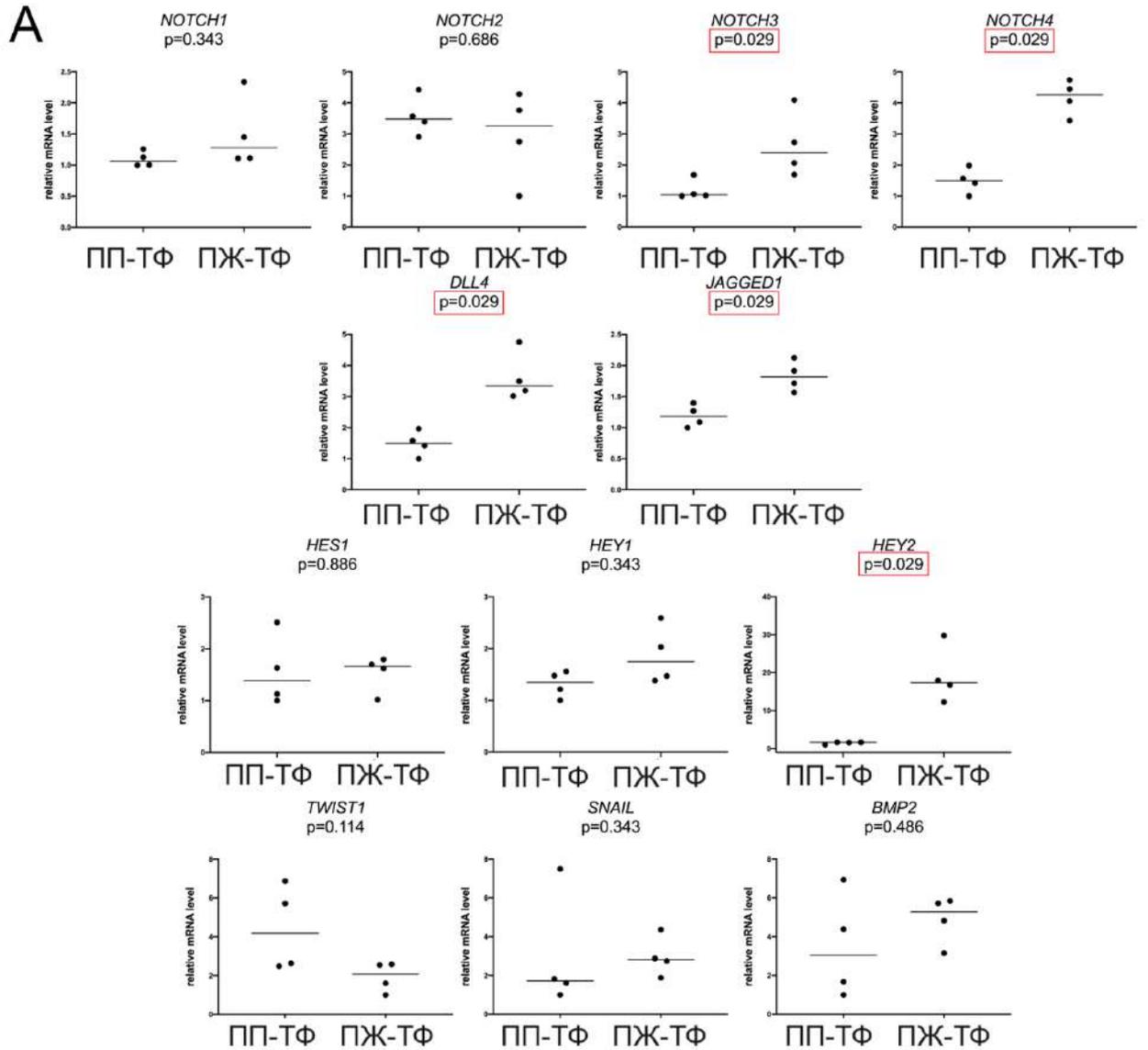
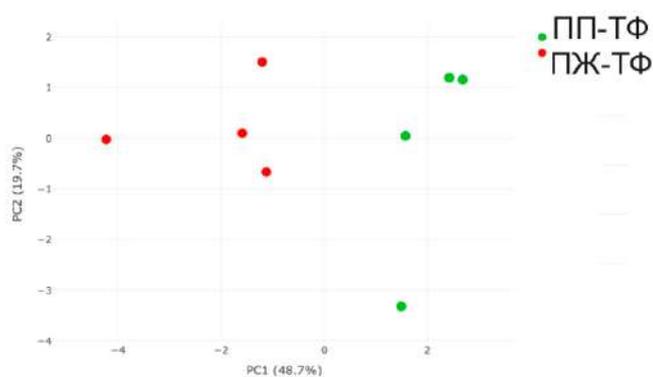
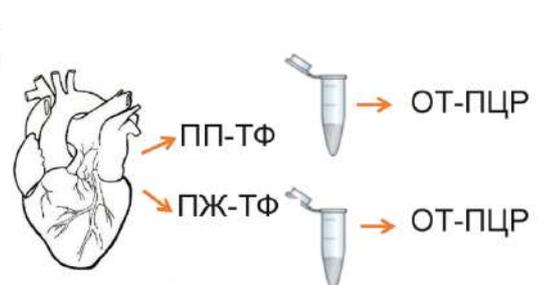
**Б****В**

Рисунок 29. Оценка экспрессии компонентов сигнального пути Notch в тканях миокарда, полученных из правого желудочка (ПЖ-ТФ) и правого предсердия (ПП-ТФ) от пациентов с ТФ. А. Уровни мРНК оценивали с помощью количественной ПЦР и нормализовали по GAPDH.

Вертикальная ось представляет относительное содержание мРНК. Группы сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; линия представляет медиану; $p < 0,05$ считается значимым и выделено красными квадратами. ПП: $n = 4$; ПЖ: $n = 4$. Точка представляет собой среднее значение, полученное количественной ПЦР и проведенное в двух повторностях для каждого образца ткани. Б. Анализ главных компонент, показывающий различия между ПЖ и ПП по профилям экспрессии генов. В. Схема эксперимента [26].

3.2.4 Уровень активации Notch связан с пролиферативной активностью ТФ-МКСч

Согласно нашей гипотезе свойства ТФ-МКСч могли зависеть не только от возраста пациентов, а также от уровня активации Notch, ввиду высокой вариабельности экспрессии его компонентов. Для этого мы проанализировали корреляцию между возрастом пациентов и низким/высоким уровнем Notch с оценкой скорости пролиферации ТФ-МКСч. Были составлены 3 возрастные группы: новорожденные <14 дней, 5–7 месяцев и >12 месяцев. Мы проанализировали пролиферацию соответствующих линий ТФ-МКСч с помощью автоматической системы xCELLigence [140], и не обнаружили какой-либо связи между возрастом пациентов и скоростью пролиферации их клеток (**рисунок 30а**).

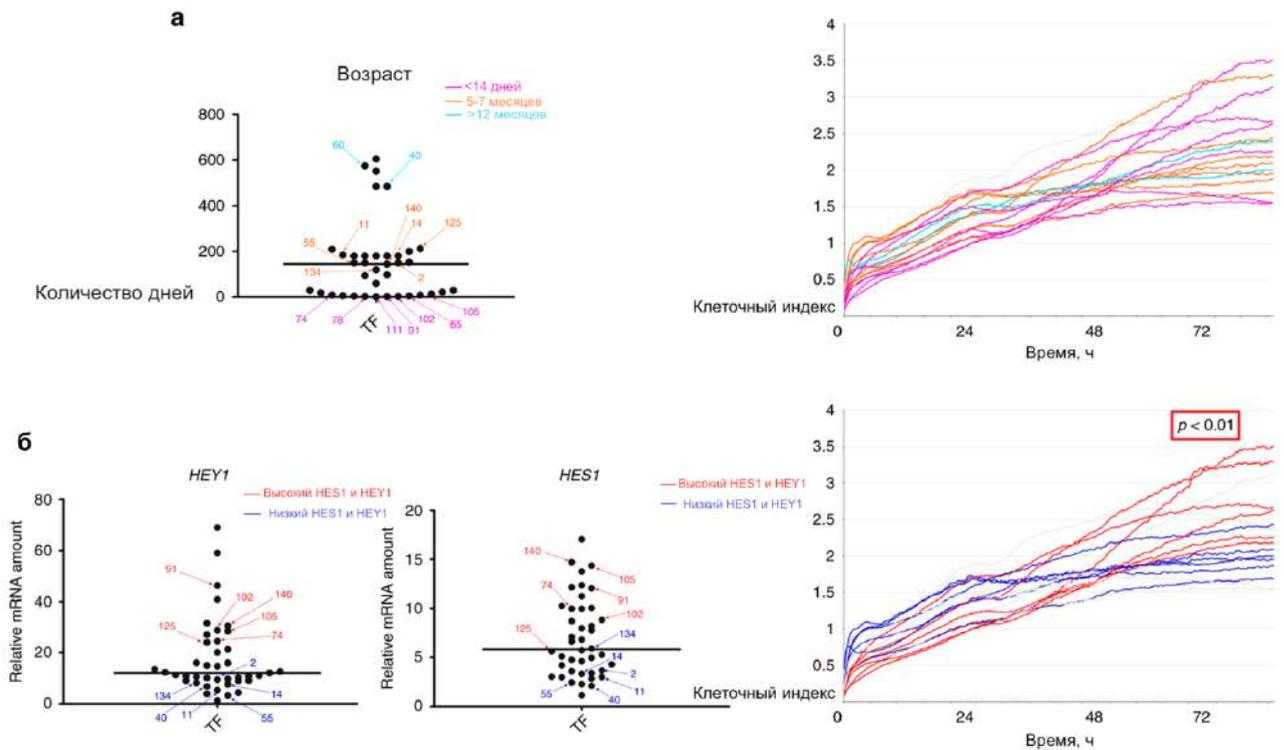


Рисунок 30. Пролiferацию клеток оценивали с помощью автоматического мониторинга деления клеток xCELLigence в режиме реального времени; $n = 16$. а Корреляция между пролиферацией ТФ-МКСч и возрастом пациентов. Пунктирный график представляет возрастное распределение

пациентов с ТФ; $n = 42$. Разным цветом обозначены ТФ-МКСч, представляющие три возрастных периода. Соответствующие им кривые роста представлены на правом графике. Б. Корреляция между пролиферацией ТФ-МКСч и активацией Notch. Пунктирные графики представляют уровни экспрессии *HES1* и *HEY1* по данным ОТ-ПЦР в ТФ-МКСч. МКС с «низким уровнем» и «высоким уровнем», обозначены синим и красным цветом, соответственно. Кривые роста представлены на правом графике. Цифры со стрелками показывают идентификаторы пациентов. Горизонтальные линии указывают медианные значения, $n = 24$ [26].

Напротив, когда мы разделили линии ТФ-МКСч в зависимости от их экспрессии *HEY1/HES1*, мы заметили, что более высокая экспрессия генов-мишеней сигнального пути Notch была связана с более высокой скоростью пролиферации, а низкая экспрессия *HEY1/HES1* давала противоположный эффект (**рисунок 30б**). Таким образом, нами было отмечено, что уровень экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch коррелирует со скоростью пролиферации ТФ-МКСч.

3.2.5 Уровень активации Notch связан с более выраженной способностью к дифференцировке ТФ-МКСч

Функциональный результат активации передачи сигналов Notch сильно зависит от контекста развития [196], и существуют противоречивые данные об активирующей и инактивирующей роли Notch в различных типах дифференцировок, включая дифференцировку в кардиогенном направлении [197]. Ранее уже был описан кардиогенный потенциал МКС [194]. Мы проанализировали влияние низкого/высокого уровня передачи сигналов Notch на способность к дифференцировке в ТФ-МКСч и показали наличие кардиогенных свойств линий МКС с помощью иммуноцитохимического окрашивания и количественной ПЦР по кардиогенным маркерам (**рисунок 31, 32**).

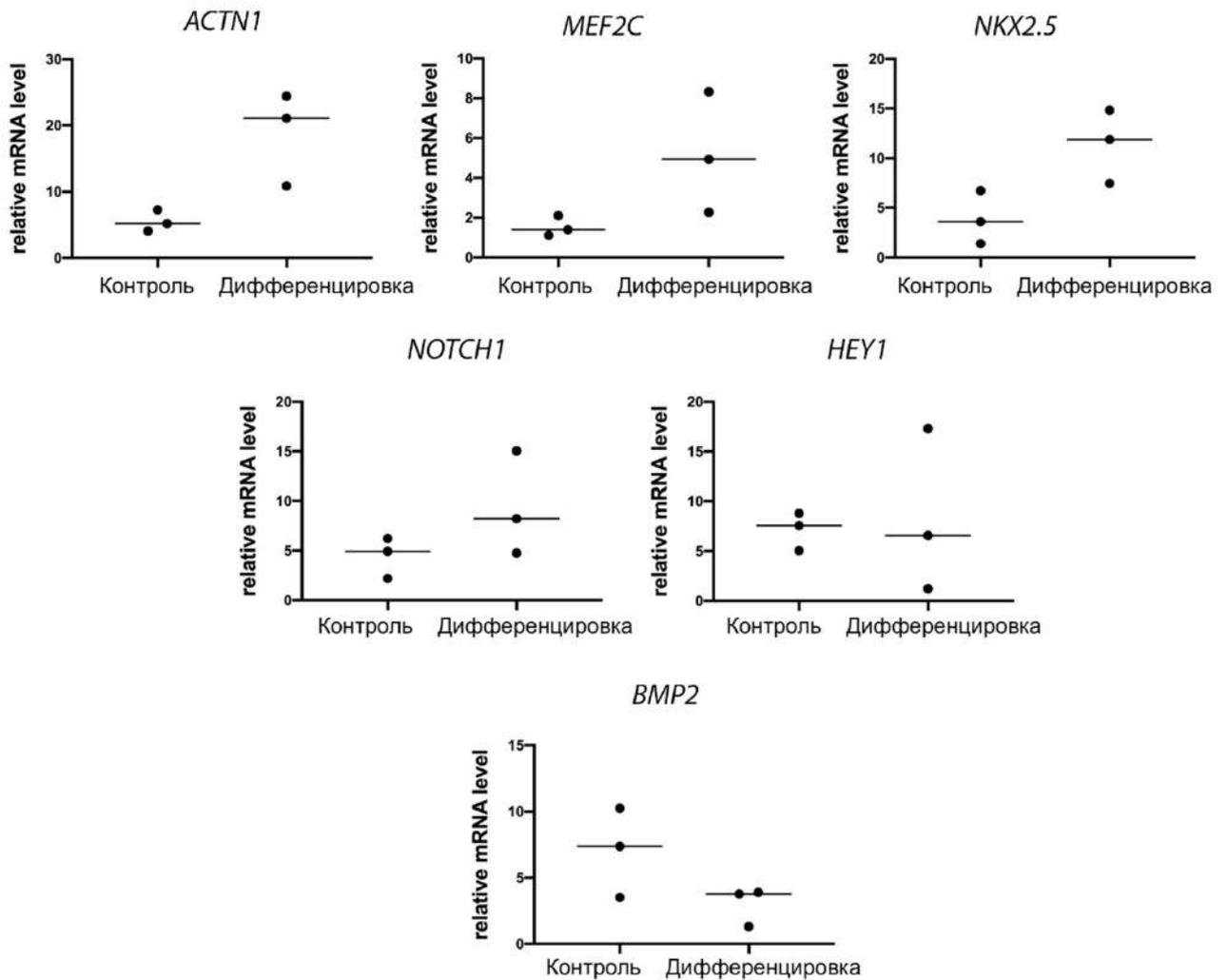


Рисунок 31. Динамика экспрессии кардиогенных генов-маркеров и компонентов сигнального пути Notch в ТФ-МКСч методом количественного ПЦР-анализа. Дифференцировка – ТФ-МКСч с направленной дифференцировкой в кардиогенном направлении, Контроль – контрольная группа без дифференцировки. По вертикали – относительное количество мРНК для каждого гена, измеренное по методу $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [26].

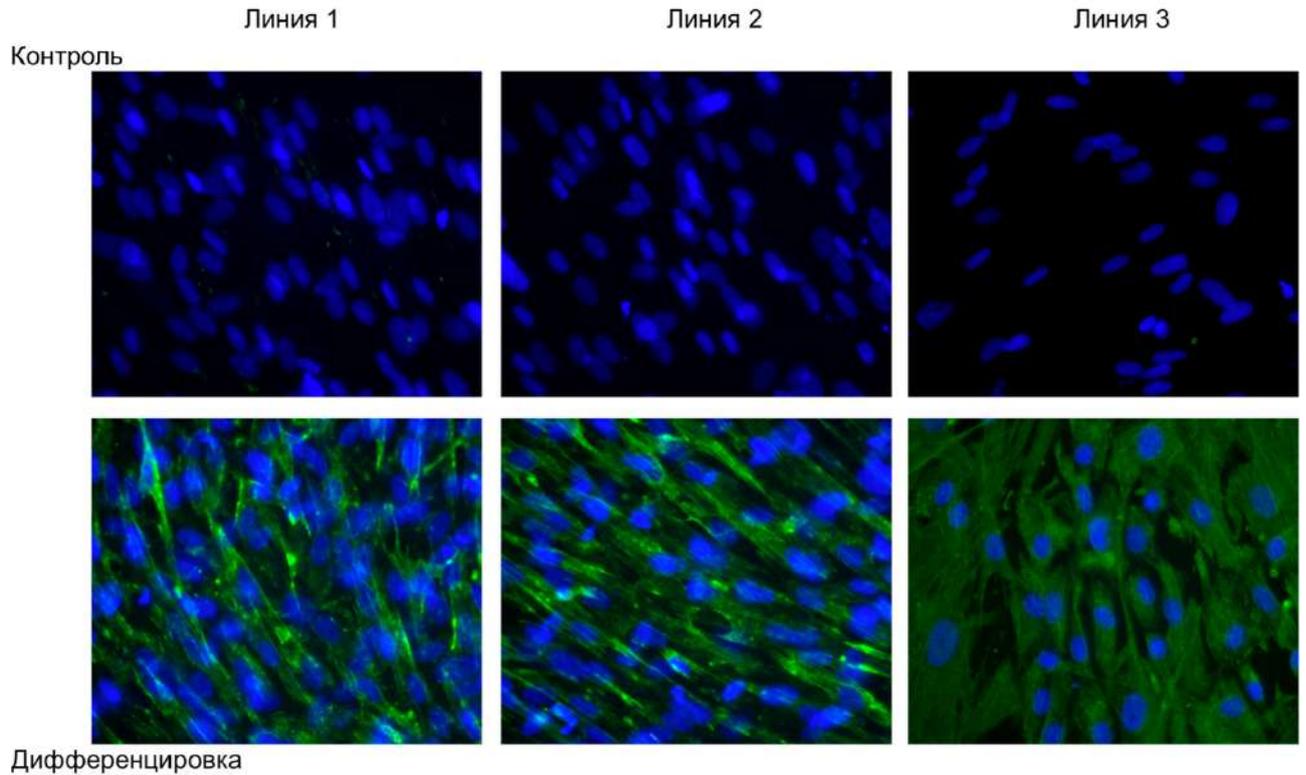


Рисунок 32. Кардиогенная (зеленый цвет) дифференцировка ТФ-МКСч. Клетки дифференцировали путем добавления в среду культивирования специфических индукторов. Иммуноцитохимическое окрашивание на α -актинин и DAPI [26].

Мы индуцировали кардиогенную дифференцировку в линиях ТФ-МКСч и разделили их на четыре группы по уровням активации Notch в виде экспрессии *NOTCH1/HEY1* (Рисунок 33).

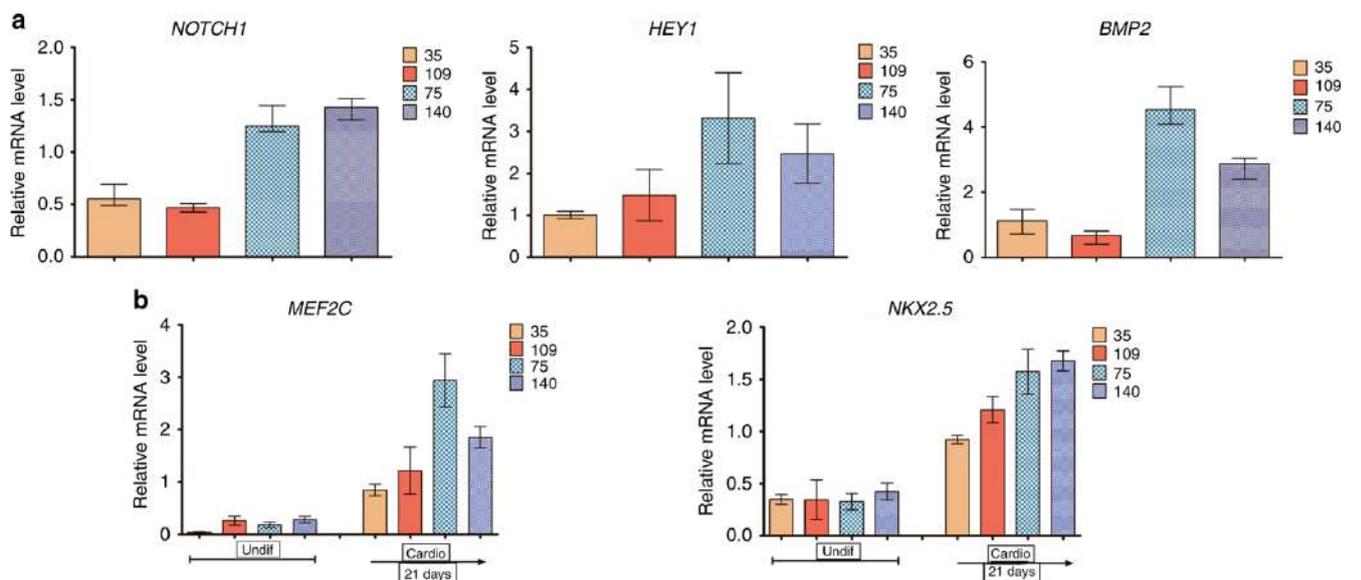


Рисунок 33. Анализ способности к дифференцировке в зависимости от исходного уровня Notch. а Четыре линии ТФ-МКСч были отобраны исходя из уровня активации Notch. Представлена оценка экспрессии *NOTCH1*, *HEY1* и *BMP2*, полученная с помощью количественной ПЦР. б Кардиогенная дифференцировка была индуцирована в четырех линиях МКС. Уровни *MEF2C* и

NKX2-5 также оценивали с помощью количественной ПЦР через 24 дня после индукции дифференцировки. Эксперименты проводились в трехкратной повторности; планки погрешностей отражают среднее значение \pm SD для трех повторов [26].

Уровень экспрессии *BMP2* соответствовал уровню *HEY1/NOTCH1* (рисунок 33а). Через 24 дня после индукции кардиогенной дифференцировки мы наблюдали повышение уровня экспрессии кардиогенных маркеров *MEF2C* и *NKX2-5* до степени, соответствующей исходному уровню активации Notch (рисунок 33б). Таким образом, повышенный уровень передачи сигналов Notch может способствовать повышенной пластичности ТФ-МКСч.

3.2.6 Notch дозозависимо способствует дифференцировке

Чтобы подтвердить, что высокие уровни активации передачи сигналов Notch могут способствовать увеличению потенциала ТФ-МКСч к дифференцировке, мы активировали Notch в клетках путём внесения лентивирусов, несущих внутриклеточный домен Notch1 – NICD [132], и индуцировали кардиогенную дифференцировку. Мы показали, что трансдукция клеток с помощью NICD привела к дозозависимому повышению экспрессии *NOTCH1* и *HEY1* в ТФ-МКСч (рисунок 34а).

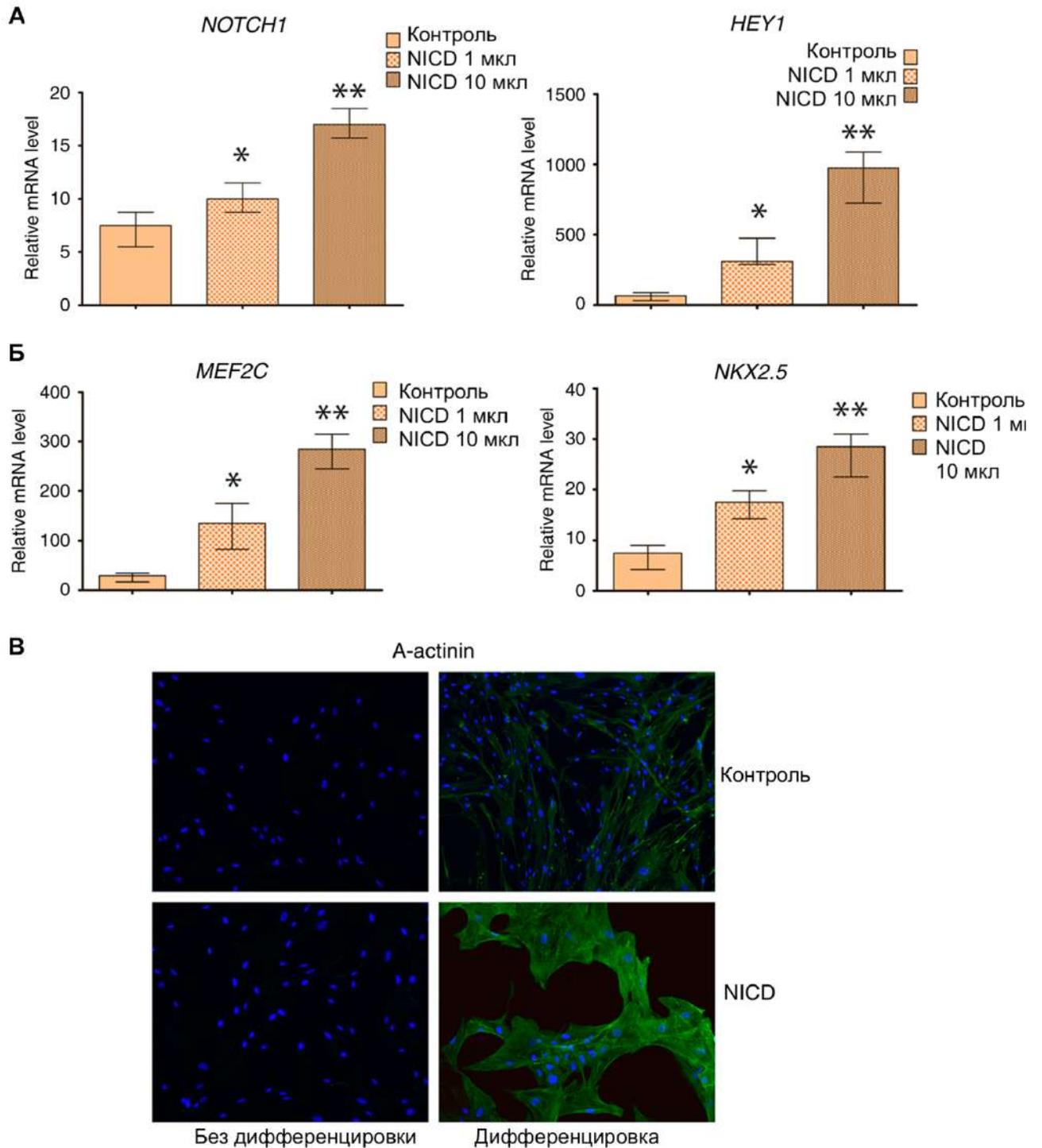


Рисунок 34. Сигнальный путь Notch оказывает влияние на кардиогенную дифференцировку ТФ-МКСч. **А.** вирусы, несущие NICD, добавляли к ТФ-МКСч (1 и 10 мкл, соответственно). Экспрессию *NOTCH1* и *HEY1* подтверждали с помощью количественной ПЦР. **Б.** Кардиогенную дифференцировку индуцировали в пяти отдельных линиях ТФ-МКСч, трансдуцированных разным количеством вирусов, несущих NICD. Гистограммы представляют экспрессию *MEF2C* и *NKX2-5* с помощью количественной ПЦР на 24-й день после индукции кардиогенной дифференцировки. Столбики погрешностей отражают среднее значение \pm SD для трех повторов. *, ** $p < 0,05$ по отношению к контрольным образцам. **В.** Иммуоцитохимическое окрашивание ТФ-МКСч на кардиогенный маркер α -актинин в присутствии/отсутствии активации

Notch с помощью NICD (NICD и контроль, соответственно) в недифференцированных и дифференцированных клетках. Эксперименты проводились в трехкратной повторности [26].

К тому же внесение NICD привело к дозозависимому повышению уровня экспрессии кардиогенных маркеров *MEF2C* и *NKX2-5* (рисунок 34б), что, в свою очередь, указывает на специфическое действие внутриклеточного домена Notch. Трансдуцированные ТФ-МКСч более интенсивно окрашивались на кардиальный маркер альфа-актинин через 24 дня кардиогенной дифференцировки (рисунок 34в). Активация ТФ-МКСч разных пациентов в ответ на введение вектора NICD представлена в виде графиков (рисунок 35).

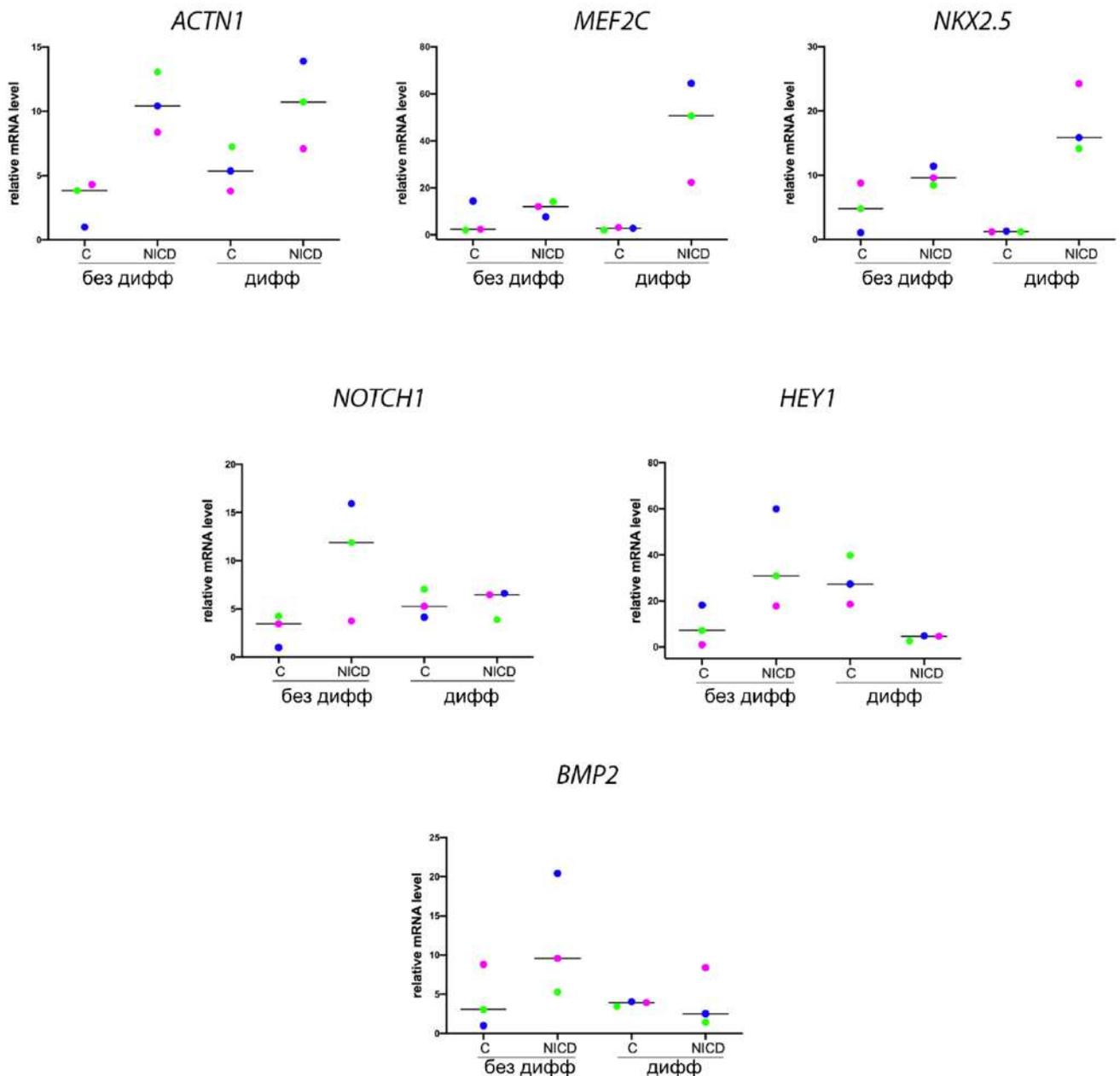


Рисунок 35. Сигнальный путь Notch оказывает влияние на кардиогенную дифференцировку ТФ-МКСч. К клеткам добавляли вектор, несущий NICD. Экспрессию гена подтверждали с помощью

количественной ПЦР. Кардиогенную дифференцировку индуцировали в трех линиях ТФ-МКСч. С - контроль, NICD – клетки, трансдуцированные NICD-вирусом. Точка представляет собой среднее значение, полученное количественной ПЦР и выполненное в двух повторностях для каждой отдельной линии ТФ-МКСч, обозначенных отдельным цветом (синий, зеленый или пурпурный). Горизонтальная линия представляет собой медиану [26].

Таким образом, нами было установлено, что активация Notch приводит к увеличению эффективности дифференцировки ТФ-МКСч.

3.2.7 Гипоксический стресс *in vitro* умеренно повышает экспрессию компонентов сигнального пути Notch

ТФ является наиболее часто встречаемым цианотическим ВПС. Эта патология включает широкий спектр тяжести: от розоцветного ТФ без гипоксемии и почти нормальной артериальной сатурации до очень цианотичных новорожденных с очень низким уровнем сатурации. Более половины больных ТФ имеют сниженный уровень сатурации (гипоксемию). В результате гипоксии страдают все ткани и органы организма, в том числе ткани головного мозга и миокарда. Роль передачи сигналов Notch в ремоделировании миокарда в условиях гипоксии не ясна. Мы предположили, что гипоксическое состояние само по себе может быть причиной повышенной экспрессии компонентов сигнального пути Notch в ТФ-МКСч. Чтобы убедиться в этом, мы культивировали ДП-МКСч от пациентов с ДМЖП в условиях гипоксии с использованием 1% и 5% уровней O_2 , соответственно, а культуру, находившуюся в условиях нормоксии (21% O_2), использовали в качестве контроля. Культивирование ДП-МКСч в условиях гипоксии вызвало только умеренное повышение транскрипции *NOTCH1* и *HEY1*, а также увеличению транскрипции *VMP2* (рисунок 36а).

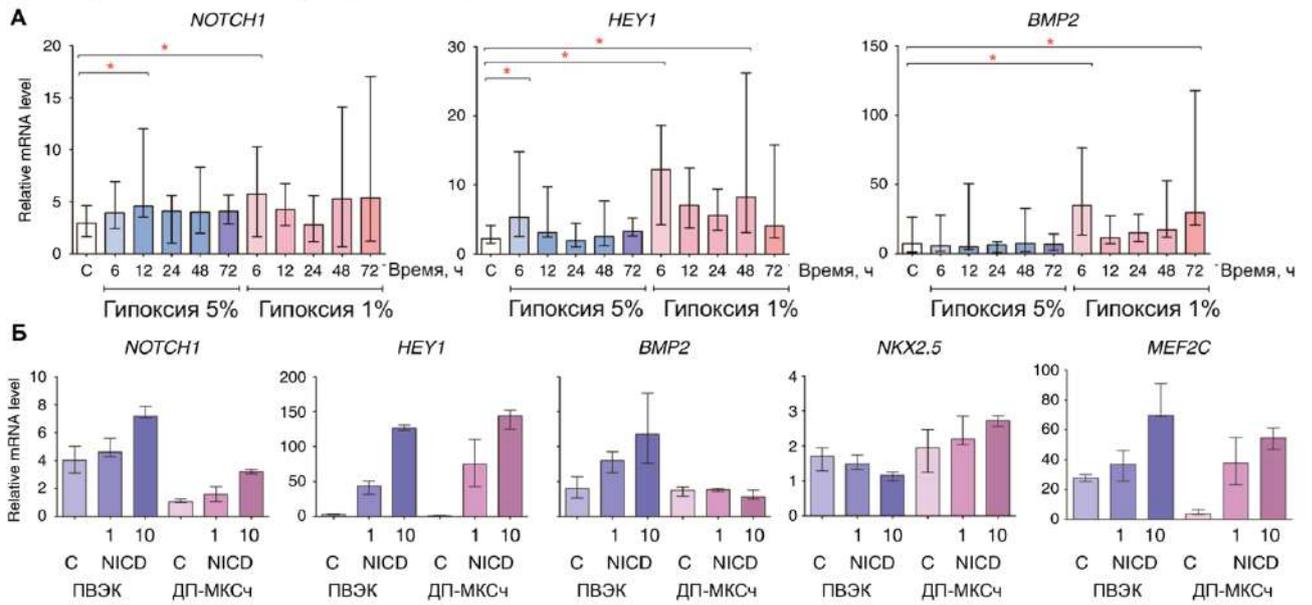


Рисунок 36. Гипоксический стресс способствует увеличению уровня экспрессии компонентов сигнального пути Notch. **А.** ДП-МКСч культивировали в условиях гипоксии с 1% (гипоксия 1%) и 5% (гипоксия 5%) уровней O_2 , соответственно, и в нормоксических условиях (21% O_2) в качестве контроля. Гистограммы представляют собой экспрессию *NOTCH1*, *HEY1* и *BMP2* методом количественной ПЦР. Группы сравнивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни; в эксперименте использовали пять линий ДП-МКСч; эксперимент был повторен три раза; * $p < 0,05$. **Б.** Анализ Notch-активированных генов в ДП-МКСч. Вирусы, несущие NICD (1 и 10 мкл, соответственно; контроль С), добавляли к ДП-МКСч или HUVES, используемым в качестве некардиогенного контроля. Гистограммы представляют собой соответствующую экспрессию генов через 48 ч после вирусной трансдукции с помощью количественной ПЦР. В эксперименте использовали три отдельные линии ДП-МКСч. Опыты проводились в трехкратной повторности [26].

Эти данные свидетельствуют о том, что гипоксическое состояние у пациентов с ТФ может потенциально способствовать активации сигнального пути Notch в ТФ-МКСч. В нашей работе [23] мы сообщали о возможном взаимодействии Notch с *BMP2* на примере ИМ-МКСч. Чтобы проверить зависит ли экспрессия *BMP2* вместе с кардиогенными маркерами от активации Notch в ДП-МКСч, мы активировали Notch в клетках с помощью лентивирусов, несущих NICD. Мы наблюдали дозозависимое повышение *NOTCH1*, *HEY1*, *MEF2C* и *NKX2.5*. HUVES использовали в качестве некардиогенного контроля. Мы также не наблюдали повышения транскрипции *BMP2* с помощью NICD в ДП-МКСч (**рисунок 36**), что позволяет предположить, что механизм активации *BMP2* в МКСч не зависит от активации Notch.

3.2.8 Обсуждение результатов по дерегуляции сигнального пути Notch в мезенхимных клетках сердца от пациентов с тетрадой Фалло

Тетрада Фалло – это наиболее частый и тяжелый цианотичный врожденный порок развития сердца, клеточные и молекулярные механизмы которого плохо изучены. В данном разделе работы была проведена оценка экспрессии Notch-зависимых генов в мезенхимных клетках сердца пациентов с ТФ. Паттерн генной экспрессии ТФ-МКСч был сравнен с генетическим профилем МКСч, полученных от пациентов с дефектом межжелудочковой перегородки. Экспрессия генов Notch значительно различалась в ТФ-МКСч, но при этом не коррелировала с возрастом пациентов или с какими-либо клиническими параметрами. Тем не менее, в исследовании было продемонстрировано, что более высокие значения экспрессии генов сигнального пути Notch способствует интенсификации процессов пролиферации и дифференциации клеток.

Кроме делеции 22q11, никакие другие генные локусы не были ассоциированы с ТФ [198]. Секвенирование экзона в спорадических несиндромальных случаях ТФ выявило локус гена *NOTCH1* как частый сайт для появления генетических вариантов, которые предрасполагают к формированию данной патологии. В данных исследованиях часто выявлялись варианты *NOTCH1*, встречающихся в функциональных повторах, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), и имеющих решающее значение для связывания лиганда и рецептора в передаче сигналов Notch [74, 199]. У пациентов с ТФ были обнаружены варианты генов, ассоциированные с передачей сигналов фактора роста эндотелия сосудов [74]. Это свидетельствует о том, что патогенез ТФ может иметь связь с сигнальными путями, ответственными за ангиогенез и эндотелиальную функцию.

При изучении сердечной ткани пациентов с тетрадой Фалло, как идиопатического, так и синдромального типа с делецией 22q11.2, было выявлено более тысячи генов с нарушенной регуляцией в тканях правого желудочка [200]. Большая часть генов, ассоциированных с передачей сигналов Wnt и Notch, имели сниженную экспрессию. Этот паттерн экспрессии генов, общий для идиопатических и синдромальных случаев ТФ, указывает на то, что эти эпизоды приводят к одному и тому же патологическому результату, несмотря на разное генетическое происхождение. Полученные данные показывают, что генетический профиль пациентов с ТФ склонен демонстрировать скорее дисбаланс в сигнальном пути Notch, чем его тотальное подавление. Эта нарушенная регуляция может быть причиной ранних отклонений в формировании сердечного паттерна, характерных для всех случаев ТФ.

Формирование сердца является комплексным процессом, контролируемым точной пространственно-временной согласованностью множества сигнальных путей, среди которых

Notch часто взаимодействует с другими передачами сигналов, такими как Wnt и BMP. Современные исследования роли сигнализации Notch в развитии сердца подтвердили его функцию как сигнального интегратора в формировании тканевого паттерна во время развития тракта оттока, воздействуя на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток [56].

В исследованиях с участием мышей, гетерозиготных по Notch1, было обнаружено, что такие животные могут выглядеть фенотипически нормальными, без явных сердечно-сосудистых проблем [201]. Однако при оценке развития аневризмы восходящей аорты у мышей с генотипом NOTCH1+/-, особенно на фоне 129S6, наблюдались существенные различия в расширении корня аорты по сравнению с мышами со смешанным генетическим фоном [202]. Результаты проведённого исследования демонстрируют значительную изменчивость генной экспрессии Notch-зависимых генов в ТФ-МКСч, что подтверждает важность генетического фона в развитии ТФ. Тем не менее, влияние ряда факторов, связанных с эффектами клеточного культивирования *in vitro*, как и разность генотипов пациентов с ТФ, может служить ограничением данного исследования. Гипоксия является одним из факторов, проявляющихся в течение заболевания у пациентов с ТФ, оказывающих влияние на сердечную ткань, и может участвовать в модуляции сигнального пути Notch [184]. Между тем, результаты исследования по индукции гипоксии *in vitro* показали лишь небольшое повышение генной экспрессии компонентов сигнального пути Notch и *Vmp2* в МКСч. Это указывает на то, что изменения в экспрессии генов в клетках пациентов с ТФ скорее обусловлены их разным генетическим фоном, чем только гипоксическим состоянием.

Перекрестное взаимодействие между сигнальным путём Notch и *Vmp2* было продемонстрировано в раннем развитии мышечного сердца [195]. Под влиянием эктопической экспрессии гена *Vmp2* в сердечной мышце меняется генетический профиль рядом расположенных клеток эндокарда, обеспечивая процесс их эпителио-мезенхимного перехода. [195, 203]. Для формирования правильного сердечного паттерна и развития камер сердца это играет ключевое значение. Результаты исследования показали изменённые уровни экспрессии компонентов сигнального пути Notch и *Vmp2* в ТФ-МКСч, которые могут отражать протекаемые патогенные процессы, нарушающие сердечный паттерн у пациентов с ТФ.

Некоторые фракции МКСч применялись в клинических испытаниях, направленных на улучшение функции сердца с одним желудочком у пациентов с синдромом гипоплазии левых отделов сердца [204]. Эти клетки рассматриваются как потенциальный источник мультипотентных клеток сердца [191, 192]. Полученные результаты продемонстрировали, что более высокие уровни экспрессии компонентов сигнального пути Notch в ТФ-МКСч соответствуют улучшенным способностям пролиферации и дифференцировки этих клеток, что согласуется с данными из литературы [197, 205, 206].

Недавние исследования акцентируют на значимость возрастного фактора при анализе стволовых качеств сердечных мезенхимных клеток. В то же время, в одном из последних исследований было обнаружено уменьшение стволовости этих клеток у пациентов младше одного месяца и старше сорока лет. Однако, другое исследование указывает на то, что дифференцировочный потенциал клеток, извлеченных из кардиосфер, сохраняется неизменным на протяжении первого года жизни [191, 192]. В контексте тетрады Фалло (ТФ) большинство пациентов подвергаются хирургическому вмешательству в очень молодом возрасте. Этот факт ограничил возможности нашего исследования полностью изучить, как возраст влияет на пролиферативное поведение мезенхимных клеток сердца (МКСч). Наш анализ не выявил какого-либо существенного влияния возраста или клинических симптомов ТФ на пролиферацию этих клеток. Примечательным аспектом нашего исследования было несоответствие между профилями экспрессии генов в образцах тканей и в МКСч. Это несоответствие создает проблемы при экстраполяции результатов, полученных из образцов тканей, к подмножествам клеток, составляющих зрелое сердце. При этом наше исследование является новаторским, в котором впервые проводилось прямое сравнение МКСч с образцами тканей сердца, взятых из правого предсердия и правого желудочка, тех же самых пациентов. Эти сравнения обогатили наше понимание биологии МКСч.

Несмотря на значительные достижения в хирургическом лечении ТФ за последние четыре десятилетия, которые привели к улучшению показателей выживаемости (90% пациентов теперь выживают в течение 30 лет после операции), эти пациенты по-прежнему сталкиваются с более низкой ожидаемой продолжительностью жизни по сравнению с общей популяцией [207]. По-прежнему распространены послеоперационные осложнения, такие как легочная регургитация, дисфункция правого желудочка, рецидивирующая обструкция оттока из правого желудочка, аритмии, внезапная смерть и дилатация аорты [208]. Это поднимает критические вопросы о долгосрочном влиянии генетических факторов, включая потенциальные нарушения регуляции генов *Notch*, на пациентов с ТФ даже после хирургической коррекции.

Наше исследование транскрипционных профилей пациентов с ТФ выявило специфическое нарушение регуляции передачи сигналов *Notch*, а не её общее подавление (**рисунок 37**). Этот паттерн может сыграть важную роль в инициации ранних процессов развития в сердце, что характерно для всех случаев ТФ. Ранее мы сообщали о подобных нарушениях регуляции гена *Notch* при различных заболеваниях сердца, таких как аневризма грудной аорты, двустворчатый аортальный клапан и кальцификация аортального клапана, независимо от мутаций в гене *NOTCH1* [209-211]. Эти данные позволяют предположить, что такие нарушения связаны с широким спектром сердечных патологий [170].

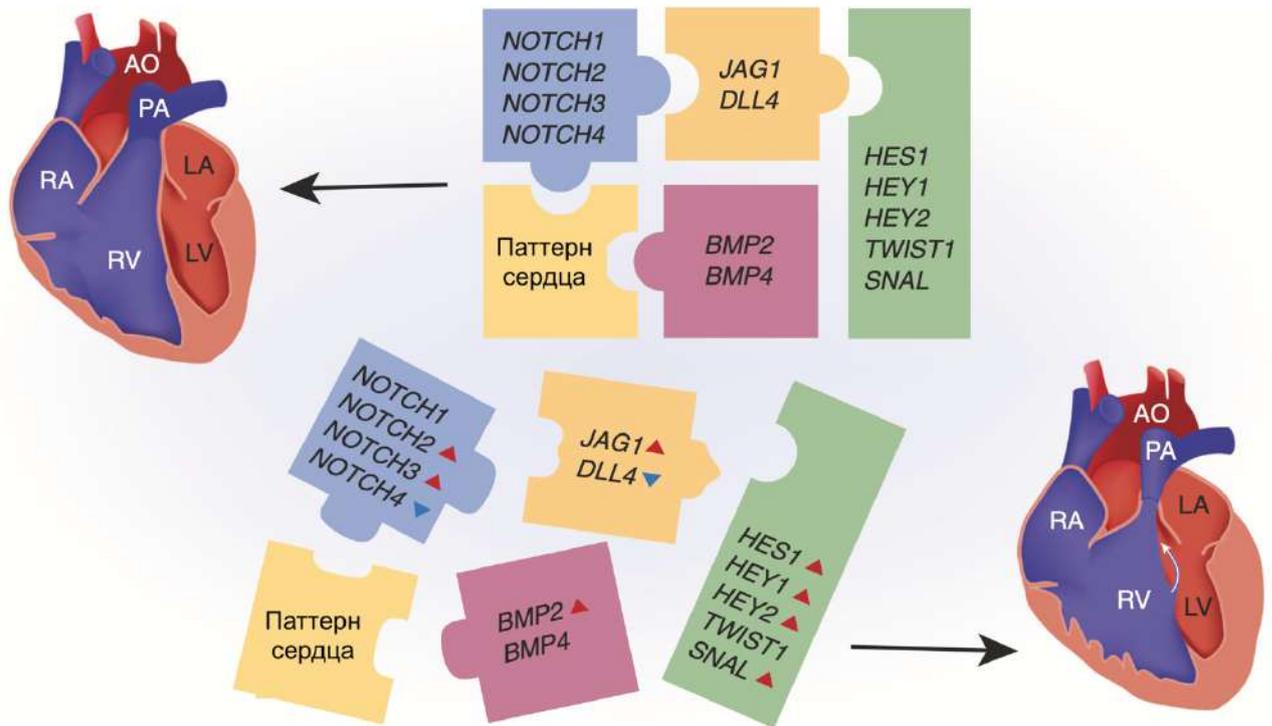


Рисунок 37. Передача сигналов Notch в патогенезе тетрады Фалло представляет собой головоломку с множеством деталей. Если соединить все компоненты вместе, то в результате получится структурно-функциональное нормальное сердце, но если выпадет одна или несколько деталей, то будет невозможно получить полную картину. Скоординированное действие генов Notch является очень важным компонентом этой головоломки [212].

Одним из существенных ограничений нашего исследования является отсутствие данных о клетках, полученных из нормального миокарда у молодых пациентов. Получение контрольных образцов соответствующего возраста, особенно у детей после коррекционных операций, представляет собой серьезную проблему. Кроме того, в нашем исследовании отсутствуют данные прямого секвенирования *NOTCH1*, что оставляет открытой возможность существования отдельных генетических вариантов в нашей когорте пациентов. Однако основные синдромальные формы были исключены из исследования. Следовательно, необходимы дальнейшие исследования для более глубокого понимания роли различных факторов, участвующих в патогенезе ТФ и биологии МКСч. Результаты этого исследования могут иметь жизненно важное значение для разработки будущих стратегий клеточной терапии заболеваний сердца.

3.3 Взаимодействие между BMP2 и сигнальным путём Notch в эндотелиальном-мезенхимном переходе в контексте фиброза миокарда

Ранее группа José Luis de la Pompa показала [213, 214], что существует взаимодействие между сигнальным путём Notch и Bmp2 в формировании сердечного клапана у мышей через Snail1 в качестве общей ткане-специфической мишени данных сигнальных путей. В развивающемся сердце они были антагонистичны по отношению друг к другу, и правильная регуляция экспрессии целевых генов обеспечивала надлежащее формирование органа благодаря специфической схеме развития [215]. Сигнальный путь Notch ингибирует фиброз при инфаркте миокарда у крыс, предотвращая трансформацию фибробластов сердца в миофибробласты путем подавления сигнализации TGF- β 1/Smad3 [216], ключевого регулятора эндоМП. Баланс между сигнализацией Notch и Bmp2 определяет судьбу фибробластов, и прогрессирование эндоМП и фиброза в сердце.

Мы предполагаем, чтобы конкретный вклад МКС в развитие фиброза сердца в контексте регуляции эндоМП опосредован взаимодействием между сигнальными путями Notch и Bmp2. Активация этих путей в МКС приводит к регуляции общих мишеней ниже по течению, что приводит к модуляции маркеров эндоМП и последующих фиброзных процессов в сердце. В данном разделе были получены свидетельства, указывающие на связь между сигнальным путём Notch и Bmp2 в регуляции эндоМП через потенциальный SLUG-зависимый механизм (*SNAIL2*) в МКС человека. Совместное культивирование МКСч и ПВЭК в двух различных комбинациях привело к противоположным клеточным реакциям в отношении экспрессии целевых генов и синтеза α -гладкомышечного актина (α -SMA). Наши результаты показывают, что активация BMP2 и Notch специфична для тканей и сильно зависит от используемого типа клеток.

3.3.1 Активация сигнальных путей Notch и BMP2 модулирует экспрессию целевых генов в МКСч и ПВЭК

Чтобы оценить влияние активации сигнализации Notch и BMP2 на экспрессию генов-мишеней, МКСч и ПВЭК были трансдуцированы лентивирусным вектором, несущим либо NICD (активную форму последовательности NOTCH1), либо BMP2. Через 48 часов была выделена общая РНК для проведения ОТ-ПЦР. «Пустой» вектор как контроль трансдукции (TRC), не имеющий генов-вставок, был использован для оценки эффекта клеточной трансдукции, а также использовались клетки без какой-либо индукции в качестве отрицательного контроля.

Было отмечено, что активация NICD привела к повышенной экспрессии целевого гена Notch - *HEY1* и рецептора *NOTCH1* в обеих клеточных культурах (**Рисунок 38**), что указывает на успешную клеточную трансдукцию с лентивирусным вектором NICD. Тем не менее, только ПВЭК показали увеличение экспрессии *BMP2* в ответ на введение вектора NICD, в то время как экспрессия *BMP2* в МКСч не изменялась. Кроме того, *RUNX2* также был подавлен в МКСч.

В ответ на добавление лентивирусного вектора с *BMP2* в клеточные культуры повышалась экспрессия *BMP2* в обеих клеточных культурах, тем самым подтверждая эффективность этого вектора (**Рисунок 38**). Кроме того, индукция *BMP2* привела к активации *HEY1* в МКСч.

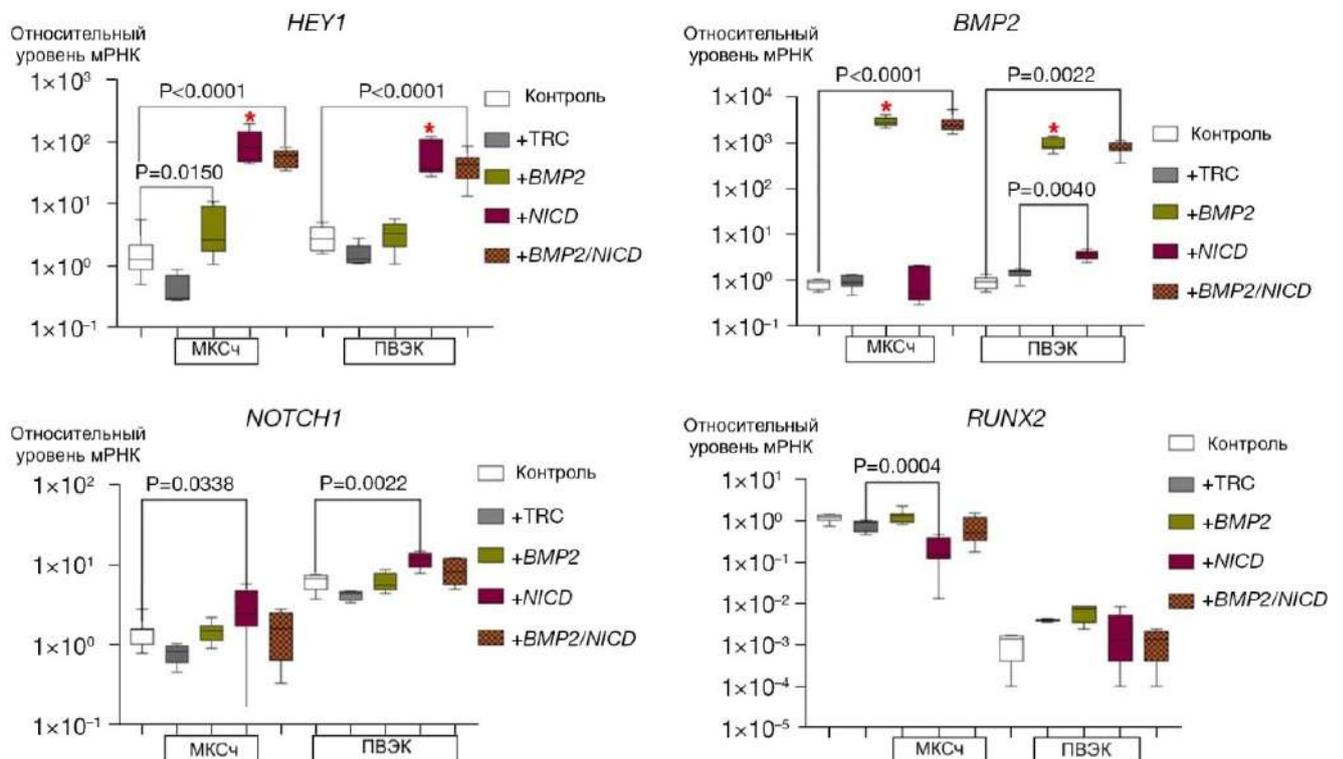


Рисунок 38. Экзогенная активация сигнального пути Notch и *Bmp2* путём использования лентивирусной конструкции, несущей последовательности NICD и/или *BMP2*, привела к увеличению экспрессии компонентов сигнальных путей. Клетки без индукции использовались в качестве отрицательного контроля, а лентивирус с TRC был вектором, который не переносил никаких генов-вставок. Ось y представляет собой относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$; представлены коробчатые графики с усами от минимума до максимума. Значения P и скобки показывают статистически значимые различия между группами при $P < 0,05$ (непарный непараметрический тест Манна-Уитни). Красная звездочка дополнительно указывает на группы, которые имеют статистически значимую разницу по сравнению с контролем и TRC. Все сравнения представлены на **Рисунке 40**. Эксперимент был повторен три раза. МКСч, мезенхимные клетки сердца человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; TRC, контроль трансдукции; *BMP2*, костный морфогенетический белок 2; NICD, внутриклеточный домен *NOTCH1* [25].

Чтобы исследовать потенциальное взаимодействие между сигнальными путями Notch и *BMP2*, были совместно трансдуцированы культуры клеток МКСч и ПВЭК лентивирусными

векторами, несущими последовательности NICD и BMP2, соответственно. Сначала был введен вектор BMP2, а затем NICD через 18 часов (+BMP2/NICD, **Рисунок 38**). Полученные результаты показали, что котрансдукция не усиливает экспрессию целевого гена по сравнению с индукцией лишь одного сигнального пути.

3.3.2 Активация Notch и BMP2 индуцирует повышенный синтез α -SMA в клетках, за исключением ПВЭК в ответ на индукцию гена BMP2

Чтобы оценить влияние сигнального пути Notch и BMP2 на экспрессию маркеров эндоМП, МКСч и ПВЭК были трансдуцированы лентивирусным вектором, несущим последовательности NICD или BMP2, соответственно. При индукции Notch (**Рисунок 39А**) наблюдалась активная транскрипция *SNAI2* (SLUG) в обоих типах клеток, в отличие от *SNAI1*, который был сверхэкспрессирован только в ответ на индукцию *BMP2* в МКСч. Кроме того, экспрессия *SNAI2* в ПВЭК увеличилась до уровня, сопоставимого с базовой экспрессией, наблюдаемой в контрольных мезенхимных клетках. Однако двойная трансдукция МКСч и ПВЭК лентивирусами с BMP2 и NICD не повысила уровень экспрессии генов маркеров эндоМП (+*BMP2/NICD*, **Рисунок 39А**).

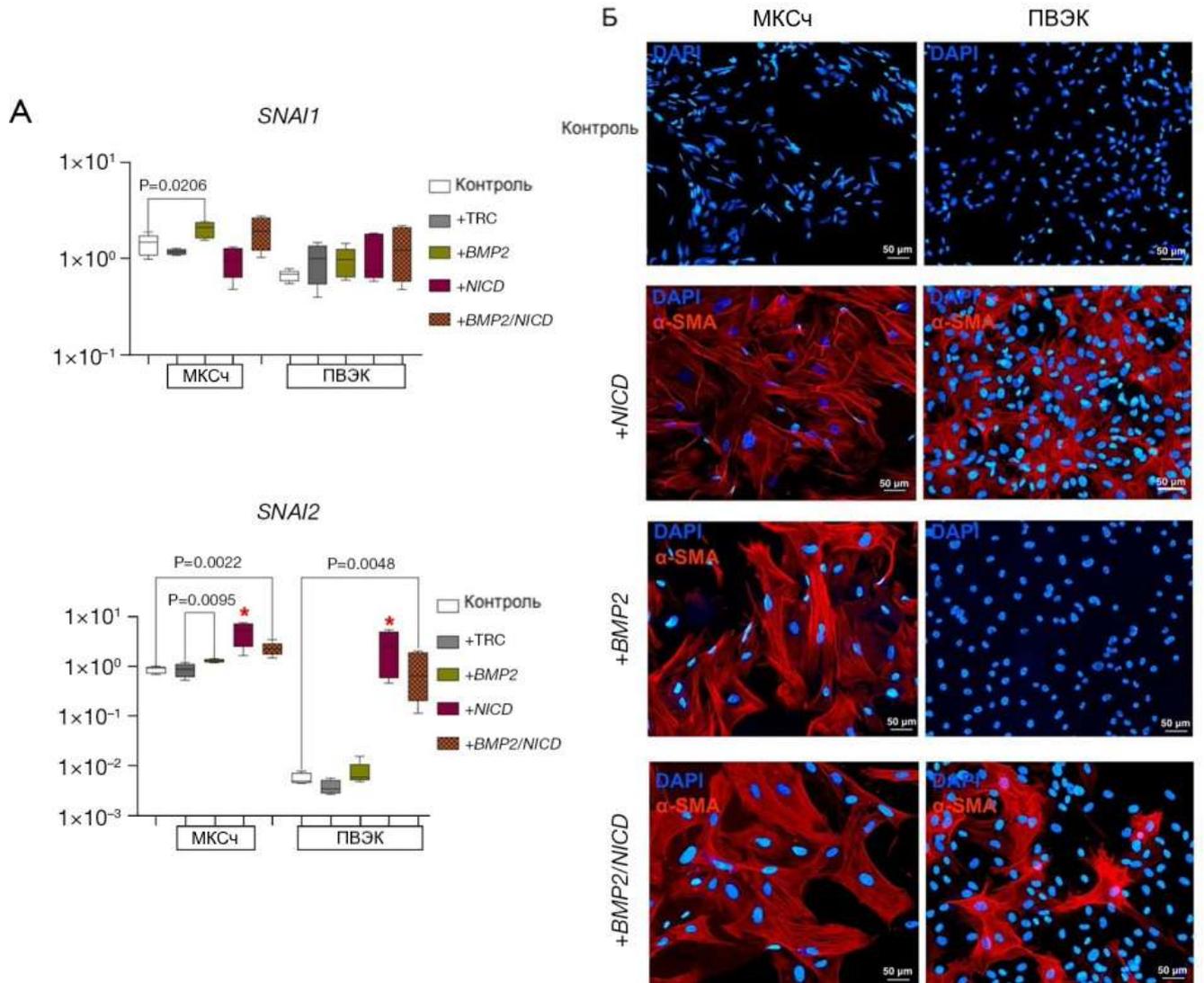


Рисунок 39. Активация сигнального пути Notch и BMP2 в ответ на введение лентивирусных конструкций, несущих последовательности NICD и/или BMP2, способствовала увеличению синтеза α -SMA в обеих культурах, за исключением ПВЭК в ответ на индукцию BMP2. (А) Динамика экспрессии *SNAI1* и *SNAI2* (маркеров эндоМП) в культурах клеток МКСч и ПВЭК в ответ на трансдукцию лентивирусных конструкций, несущих последовательности NICD и/или BMP2. Клетки без индукции использовались в качестве отрицательного контроля, а вирус TRC был вектором, который не переносил никаких генов-вставок. Ось у представляет собой относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$; представлены коробчатые графики с усами от минимума до максимума. Значения Р и скобки показывают статистически значимые различия между группами при $P < 0,05$ (непарный непараметрический тест Манна-Уитни). Красная звездочка дополнительно указывает на группы, которые имеют статистически значимую разницу по сравнению с контролем и TRC. Все сравнения представлены на **Рисунке 41**. (Б) Иммунофенотипирование МКСч и ПВЭК на маркер эндоМП - α -SMA, в ответ на индукцию сигнальных путей Notch и/или BMP2. Эксперимент был повторен три раза. МКСч, мезенхимные клетки сердца человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; TRC, контроль трансдукции; BMP2, костный морфогенетический белок 2; NICD, внутриклеточный домен NOTCH1; α -SMA, α -гладкомышечный актин; эндоМП, эндотелиально-мезенхимный переход; DAPI, 4',6-диамидин-2-фенилиндол [25].

α -SMA является важным маркером эндоМП в эндотелиальных и в мезенхимных клетках, последние из которых активированы во время развития или травмы [217-220]. Чтобы оценить активацию эндоМП в культурах МКСч и ПВЭК в ответ на индукцию сигнального пути Notch и BMP2, было проведено иммуноокрашивание на α -SMA. МКСч, как и ПВЭК, не синтезировали α -SMA в контроле без индукции (**Рисунок 39Б**). Активация Notch привела к накоплению α -SMA как в МКСч, так и в ПВЭК (**Рисунок 39Б**). Тем не менее, трансдукция клеточных культур лентивирусом с BMP2 способствовала синтезу α -SMA только в МКСч, что соответствует уровням экспрессии *SNAIL1* и *SNAIL2*, показанных с помощью ОТ-ПЦР. В результате добавления обоих векторов мы наблюдали активацию эндоМП как в МКСч, так и в ПВЭК (**Рисунок 39Б**). Тем не менее, синтез α -SMA был менее выраженным в ПВЭК, чем в МКСч.

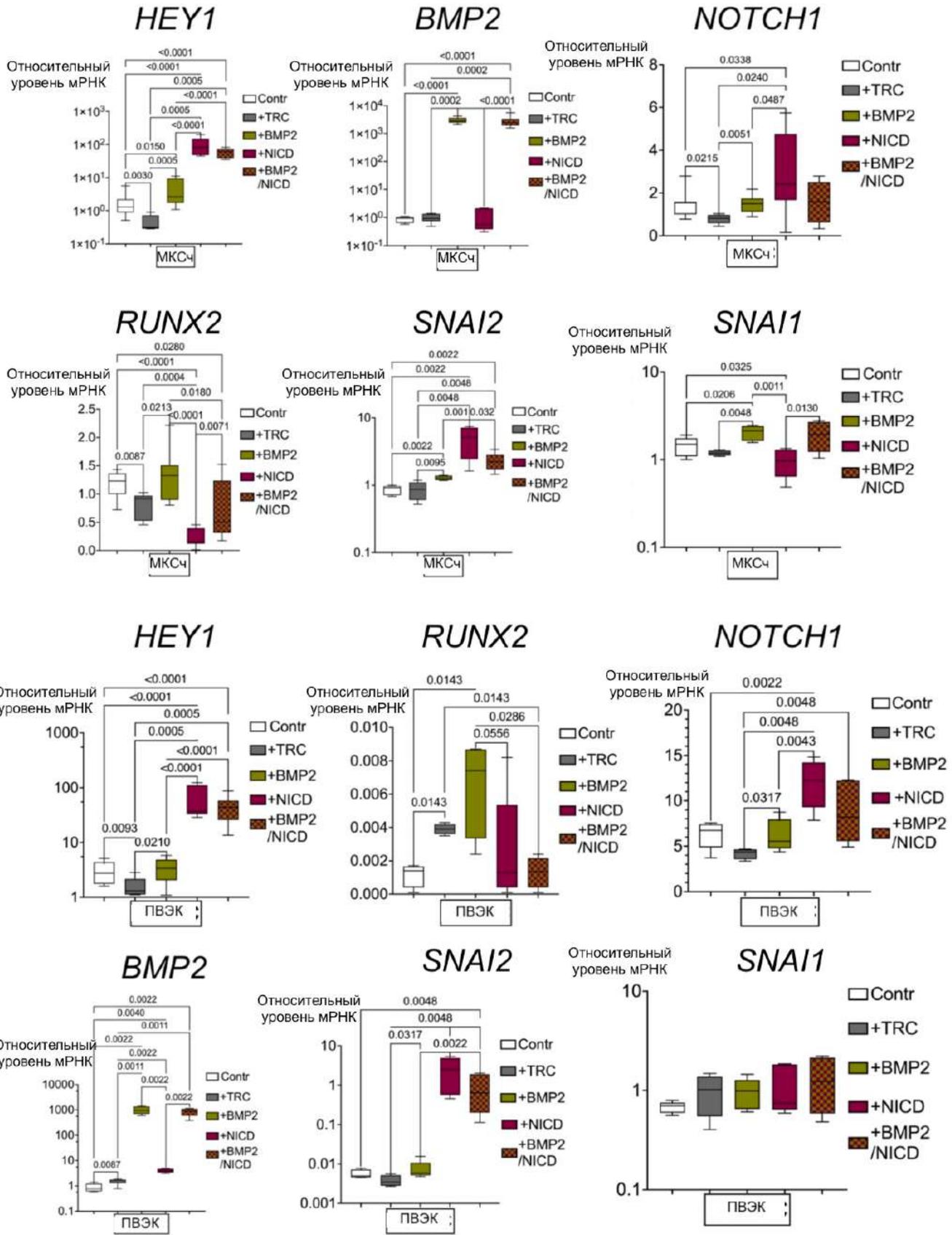


Рисунок 40. Экзогенная активация сигнального пути Notch и *Vmp2* путем введения лентивирусной конструкции, несущей последовательности NICD и/или *VMP2*, приводила к увеличению экспрессии компонентов сигнального пути. Клетки без индукции использовались в качестве негативного контроля, а вирус TRC был вектором, который не нес генов-вставок. Ось *Y* представляет относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Представлены коробчатые графики с усами от минимума до максимума. Значения *P* (числа) и скобки показывают значимые различия между группами при $P < 0,05$ (непарный непараметрический критерий Манна-Уитни). Эксперимент повторяли три раза. МКСч, мезенхимные клетки сердца человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; Contr, контроль; TRC, «пустой» вектор; *VMP2*, костный морфогенетический белок 2; NICD, внутриклеточный домен NOTCH1 [25].

3.3.3 Совместное культивирование МКСч и ПВЭК изменяет экспрессию генов-мишеней, и влияет на активацию гена *HEY1* и гена *VMP2* при двойной трансдукции культур МКСч/ПВЭК

Учитывая, что сигнальный путь Notch, как известно, опосредует межклеточную связь, было исследовано влияние совместного культивирования мезенхимных и эндотелиальных клеток на экспрессию сигнального пути Notch и *VMP2*. При добавлении лентивирусного вектора NICD наблюдалась повышенная экспрессия *HEY1* в обоих типах сокультивирования. Тем не менее, экспрессия *NOTCH1* увеличилась только в сокультуре ПВЭК/МКСч. Аналогичным образом, трансдукция клеточных культур с помощью вектора *VMP2* привело к активации *VMP2* в обеих сокультурах, подтверждая эффективность векторов при сокультивировании.

Наши выводы (**Рисунок 41**) показывают изменчивость профиля экспрессии в клеточных культурах, на которую, по-видимому, влияет порядок посева клеток. В частности, наблюдалось снижение экспрессии генов-мишеней по сравнению с условиями монокультивирования. Тем не менее, было отмечено стимулирующее влияние на экспрессию *HEY1* и *VMP2* в ответ на двойную трансдукцию, особенно в сочетании культур МКСч/ПВЭК (+*VMP2/NICD*, **Рисунок 41**).

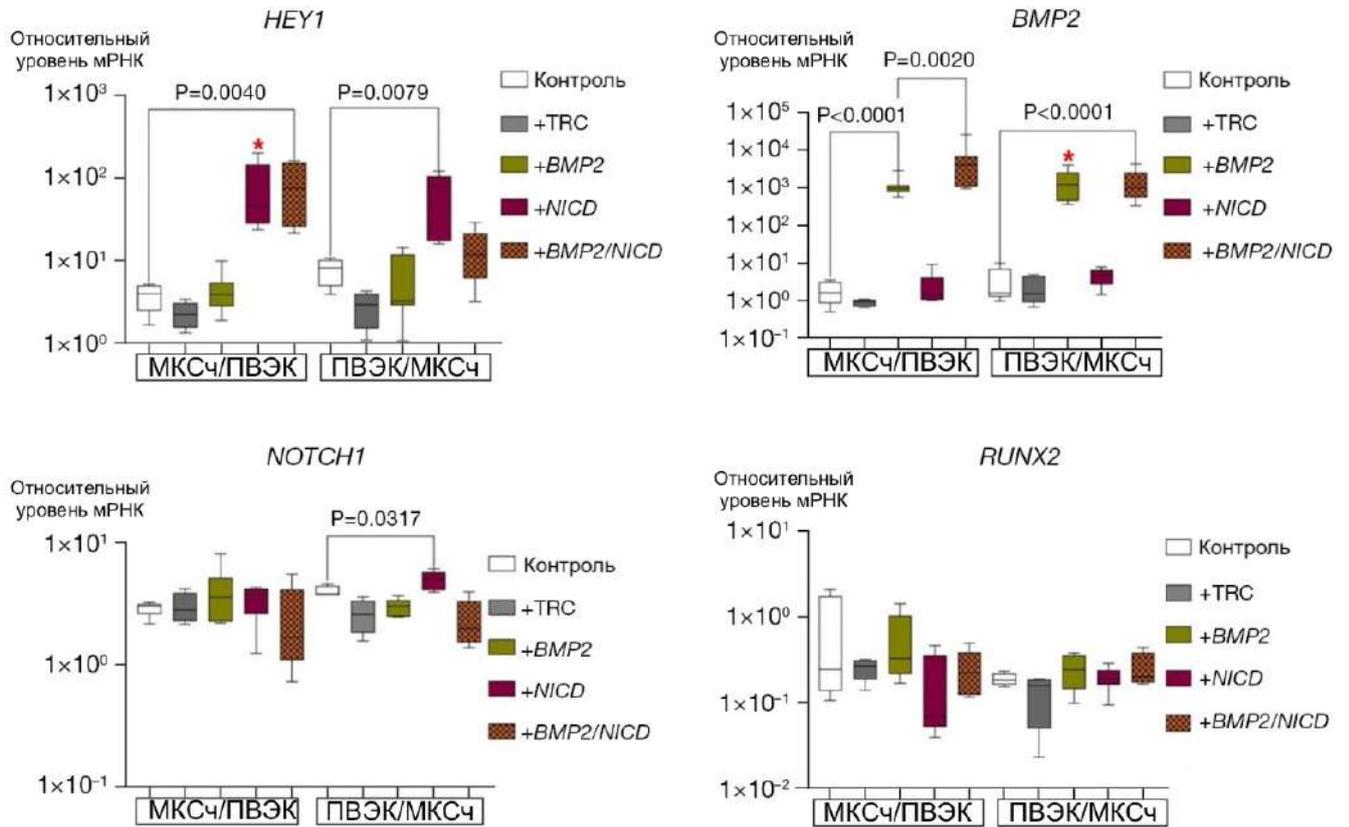


Рисунок 41. Активация сигнального пути Notch и BMP2 при совместном культивировании МКСч и ПВЭК в ответ на введение лентивирусной конструкции, несущей последовательности NICD и/или BMP2, привела к снижению экспрессии целевых генов по сравнению с активацией данных сигнальных путей при монокультивировании. Клетки без индукции использовались в качестве отрицательного контроля, а вирус TRC был вектором, который не нёс генов-вставок. Ось у представляет собой относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$; представлены коробчатые графики с усами от минимума до максимума. Значения P и скобки показывают статистически значимые различия между группами при $P < 0,05$ (непарный непараметрический тест Манна-Уитни). Красная звездочка дополнительно указывает на группы, которые имеют статистически значимую разницу по сравнению с контролем и TRC. Все сравнения представлены на **Рисунке 43**. Эксперимент был повторен три раза. МКСч, мезенхимные клетки сердца человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; TRC, контроль трансдукции; BMP2, костный морфогенетический белок 2; NICD, внутриклеточный домен NOTCH1 [25].

3.3.4 Индукция синтеза α -SMA в МКСч модулируется активацией BMP2 и BMP2/NICD во время совместного культивирования и это коррелирует с экспрессией *SNAI2*

Чтобы оценить влияние совместного культивирования МКСч и ПВЭК на синтез α -SMA в ответ на индукцию сигнальных путей Notch и BMP2, было проведено иммунофенотипирование клеточных кокультур на α -SMA. Полученные результаты (**Рисунок 42**) показывают, что активация сигнального пути Notch индуцирует синтез α -SMA как в кокультуре МКСч/ПВЭК, так

и в кокультуре ПВЭК/МКСч, независимо от порядка посева. Двойная трансдукция кокультуры МКСч/ПВЭК привела к увеличению экспрессии *BMP2* (+*BMP2/NICD*, **Рисунок 41**) и, наоборот, к подавлению экспрессии маркеров эндоМП (+*BMP2/NICD*, **Рисунок 42А**). Это было отражено также в подавлении накопления α -SMA в присутствии одного вектора *BMP2*, или двух векторов *BMP2* и *NICD* (+*BMP2/NICD*, **Рисунок 42Б**).

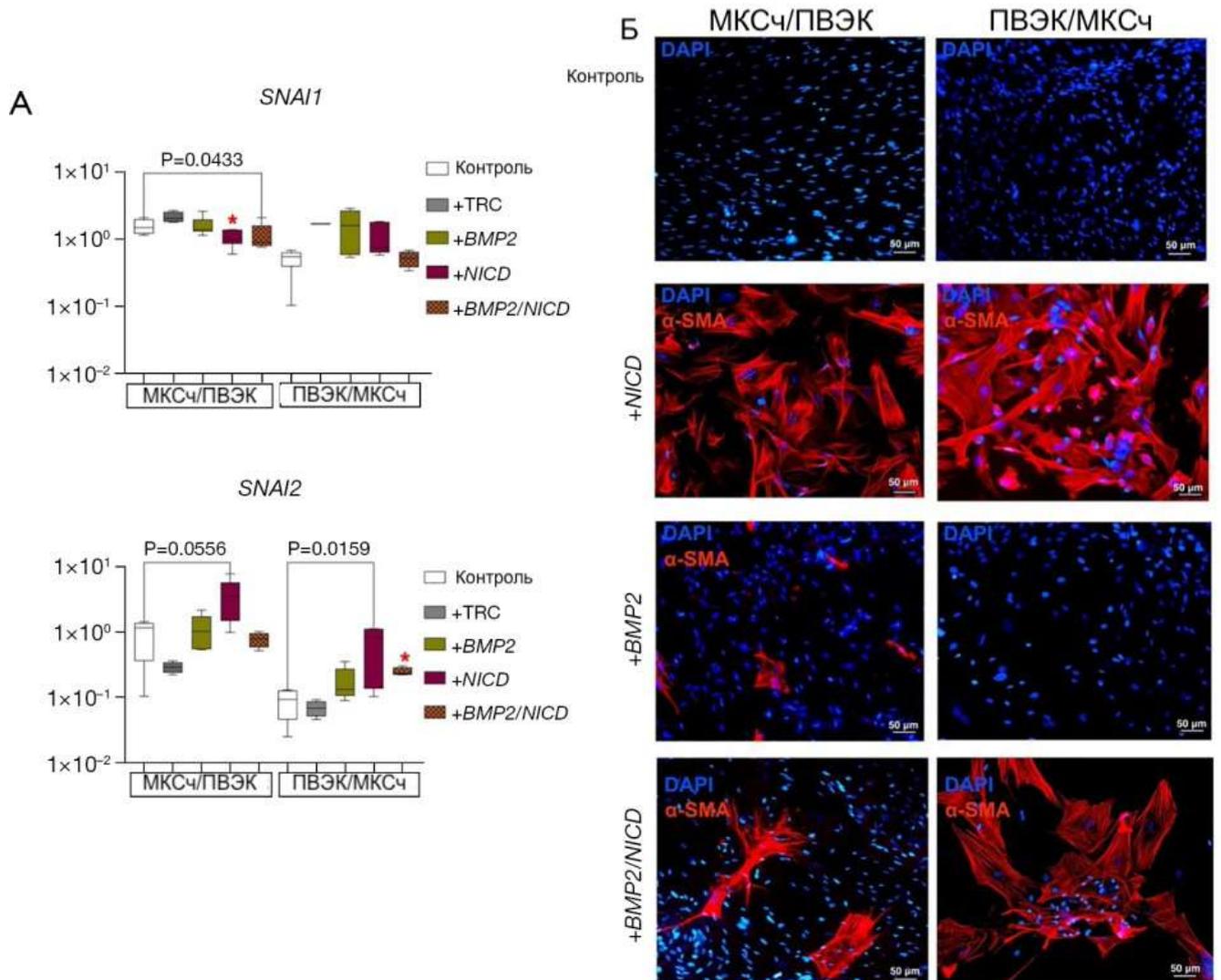


Рисунок 42. Синтез α -SMA в МКСч снижается в ответ на активацию *BMP2* и *BMP2/Notch* во время совместного культивирования. (А) Динамика экспрессии *SNAI1* и *SNAI2* (маркеров эндоМП) в культурах клеток МКСч и ПВЭК в ответ на трансдукцию лентивирусными конструкциями, несущими последовательности *NICD* и/или *BMP2*. Клетки без индукции использовались в качестве отрицательного контроля, а вирус TRC был вектором, который не имел генов-вставок. Ось у представляет собой относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$; представлены коробчатые графики с усами от минимума до максимума. Значения *P* и скобки показывают статистически значимые различия между группами при $P < 0,05$ (непарный непараметрический тест Манна-Уитни). Красная звездочка дополнительно указывает на группы, которые имеют статистически значимую разницу по сравнению с контролем и TRC. Все сравнения представлены на **Рисунке 43**. (Б) Иммунофенотипирование МКСч и ПВЭК на маркер эндоМП - α -SMA при индукции сигнальных путей Notch и/или *BMP2*. Эксперимент был повторен три раза. МКСч, мезенхимные клетки сердца человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; TRC, контроль трансдукции; *BMP2*, костный

морфогенетический белок 2; NICD, внутриклеточный домен NOTCH1; α -SMA, α -гладкомышечный актин; эндоМП, эндотелиально-мезенхимный переход; DAPI, 4',6-диамидин-2-фенилиндола [25].

Трансдукция клеточных культур лентивирусом с BMP2 оказала ингибирующее действие на накопление α -SMA в мезенхимных клетках и это сопровождалось также снижением экспрессии *SNAI2* при культивировании вместе с эндотелиальными клетками. Активация сигнального пути Notch и BMP2 привела к индукции эндоМП в кокультурах ПВЭК/МКСч (+BMP2/NICD, **Рисунок 42Б**), и это коррелировало с накоплением *SNAI2* (+BMP2/NICD, **Рисунок 42А**). Напротив, мы заметили, что экспрессия *SNAI1* была подавлена в ответ на индукцию Notch и двойную трансдукцию в кокультуре МКСч/ПВЭК.

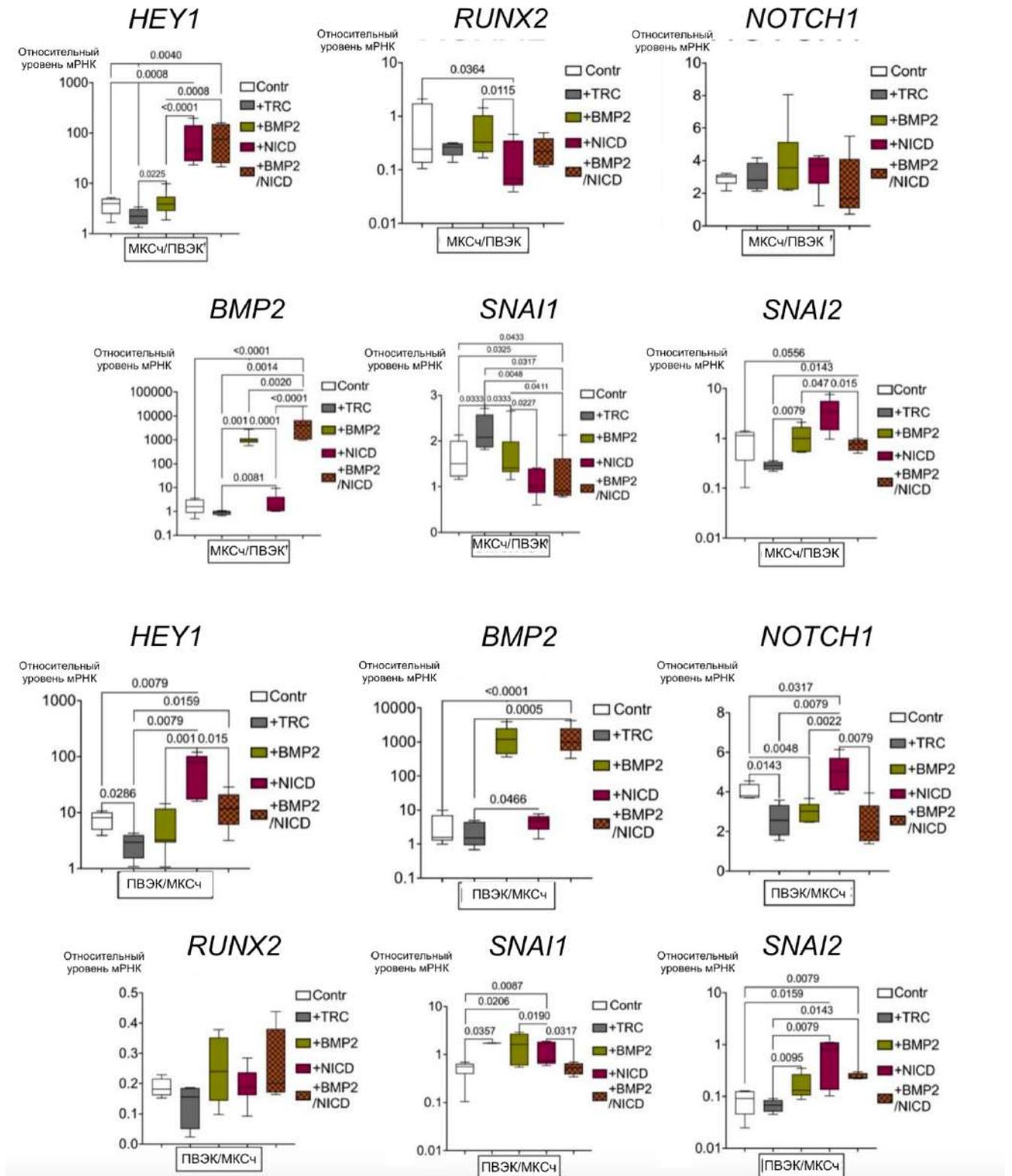


Рисунок 43. Активация сигнального Notch и BMP2 путём совместного культивирования MKC4 и PV3K в ответ на введение лентивирусной конструкции, несущей последовательности NICD и/или BMP2, привела к снижению экспрессии целевых генов по сравнению с монокультурами. Клетки без индукции использовались в качестве отрицательного контроля, а вирус TRC был вектором, который не переносил генов-вставок. Ось y представляет собой относительное количество мРНК в каждой группе, измеренное методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$; представлены коробчатые графики с усами от минимума до максимума. Значения P (числа) и скобки показывают значительные различия между

группами в $P < 0,05$ (непарный непараметрический тест Манна-Уитни). Эксперимент был повторен три раза. МКСч, мезенхимные клетки сердца человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; Contr, контроль; TRC, «пустой» вектор; BMP2, костный морфогенетический белок 2; NICD, внутриклеточный домен NOTCH1 [25].

3.3.5 Обсуждение результатов взаимодействия между BMP2 и сигнальным путём Notch в эндотелиально-мезенхимном переходе

ЭндоМП — это критический процесс, связанный с развитием и нарушениями сердечно-сосудистой системы [221]. Хотя было показано, что эмбриональные сигнальные пути, такие как Notch и *Vmp*, регулируют эндоМП, их взаимодействия в этом процессе еще не полностью изучены. Следовательно, определение способа регулирования этих путей является приоритетом для лечения сердечно-сосудистых патологий во взрослом возрасте.

Для этого были индуцированы сигнальные пути Notch и *Vmp* (в частности, BMP2) в МКСч и ПВЭК с использованием различных комбинаций. Клетки трансдуцировались векторами, несущими NICD и/или BMP2, и через 48 часов была выделена РНК для проведения ОТ-ПЦР, чтобы оценить экспрессию компонентов пути Notch и *Vmp* и активацию маркеров ЭндоМП. Иммуноцитохимическое окрашивание на α -SMA использовалось для определения эндоМП через 14 дней после индукции.

Сигнальный путь Notch включает в себя рецепторы (например, NOTCH1), лиганды и гены-мишени (например, HEY1). В каноническом сигнальном пути Notch рецептор и лиганд двух соседних клеток взаимодействуют, что приводит к протеолитическому расщеплению внутриклеточной части рецептора и транслокации NICD в ядро для активации экспрессии целевого гена. Сигнальный путь Notch был индуцирован в МКСч и ПВЭК с помощью лентивирусного вектора, несущего последовательность NICD. После активации обе культуры показали увеличение экспрессии рецепторов *HEY1* и *NOTCH1*. Кроме того, трансдукция клеточных культур NICD привела к синтезу и последующему накоплению α -SMA как в МКСч, так и в ПВЭК через 14 дней после индукции. Было обнаружено, что активация пути Notch с использованием NICD увеличивает экспрессию *BMP2* в ПВЭК, но не оказывает влияния на МКСч. Также наблюдалось снижение экспрессии *RUNX2*, одного из генов-мишеней *Vmp* [222, 223], в МКСч, что указывает на два противоположных процесса в эндотелиальных и мезенхимных клетках.

BMP2 является фактором роста и компонентом суперсемейства TGF- β , который играет роль во многих процессах развития, включая кардиогенез, нейрогенез и остеогенез [153-155]. BMP2

также был отмечен в процессах эпителио-мезенхимного перехода (ЭМП) в процессе развития [224, 225]. Было показано, что сигнальный путь Notch регулирует BMP2 во время остеогенной дифференцировки [226]. Тем не менее, его точная регуляция в контексте эндоМП и его взаимодействие с другими эмбриональными сигнальными путями, включая Notch, все ещё не полностью изучены. Трансдукция клеточных культур вектором с BMP2 успешно регулирует экспрессию *BMP2* в МКСч и ПВЭК. Было обнаружено, что индукция BMP2 в МКСч привела к увеличению экспрессии *HEY1* (гена-мишени Notch) и не оказала никакого влияния на изменение экспрессии *NOTCH1*, что может указывать на взаимодействие только с мишенями ниже по течению. В то же время активация BMP2 в ПВЭК не повлияла на экспрессию компонентов сигнального пути Notch. Кроме того, добавление BMP2 оказало индуцирующее влияние, в частности, на МКСч, что привело к синтезу и накоплению α -SMA. Однако, в отличие от МКСч, ПВЭК не реагировали на активацию BMP2, что указывает на потенциальный ткане-специфичный эффект данного сигнального пути.

Во время ЭМП в сердце клетки эндокарда претерпевают значительные изменения в экспрессии генов, включая Notch-зависимую индукцию *ACTA2* (α -SMA), *SNAIL* и *SNAI2* [132]. Несмотря на различия в активации BMP2 (**Рисунок 38**), наблюдалось увеличение экспрессии *SNAI2* в обеих культурах после добавления NICD (**Рисунок 39А**). Однако это не повлияло на экспрессию *SNAIL* (**Рисунок 39А**).

Трансдукция вектором с BMP2 привела к увеличению экспрессии *BMP2* в обеих культурах, но экспрессия маркеров эндоМП различалась между МКСч и ПВЭК. В то время как *SNAI2* был активирован в обеих культурах, но только МКСч экспрессировали *SNAIL*. Скоординированная работа сигнального пути Notch и BMP2 была отмечена ранее в процессах развития сердечно-сосудистой системы [214]. Эктопическая экспрессия одного сигнального пути часто приводила к подавлению другой сигнальной системы в той же ткани. Тем не менее, координированная сигнализация была описана, например, между миокардом и эндокардом, а также во время формирования сердечного клапана с активацией *SNAIL* и влиянием на процессы ЭМП [227].

Попеременная активация сигнальных путей Notch и Bmp в МКСч и ПВЭК обеспечивалась путём внесения вектора с BMP2, а через 18 часов добавлением NICD. Было отмечено, что двойная трансдукция не увеличивает экспрессию маркеров сигнальных путей и эндоМП в обеих культурах по сравнению с одиночной индукцией и, скорее всего, снижает эффективность их экспрессии. Интересно, что при изучении влияния двойной трансдукции не наблюдалось значительного влияния на накопление α -SMA в МКСч. Уровни α -SMA были сопоставимы с теми, которые были отмечены при одиночной индукции, что указывает на то, что двойная трансдукция также привела к синтезу α -SMA. Тем не менее, эффект был менее выражен в ПВЭК, что указывает

на то, что эти сигнальные пути могут иметь противоположные эффекты в этом конкретном типе клеток.

Согласно гипотезе, взаимодействие между сигнальным путём Notch и BMP2 может измениться при сокультивировании мезенхимных и эндотелиальных клеток. МКСч и ПВЭК были рассеяны по очереди с разницей в 24 часа в двух противоположных комбинациях. Оценка экспрессии генов Notch, BMP2 и эндоМП в ответ на индукцию показала снижение экспрессии генов-мишеней по сравнению с монокультивированием. Несмотря на использование одних и тех же клеточных культур, но посеянных в разных комбинациях, наблюдались ярко выраженные клеточные реакции в виде экспрессии *HEY1* и *NOTCH1* в ответ на введение NICD и BMP2. В комбинации МКСч/ПВЭК последовательно увеличивалась экспрессия *HEY1* при добавлении NICD и BMP2/NICD. Однако в комбинации ПВЭК/МКСч только введение вектора NICD привело к активации *HEY1*. Наблюдаемое несоответствие подразумевает возможное влияние порядка посева на межклеточную связь, на которое потенциально влияет первоначальное преобладание культуры ПВЭК в культуральной чашке. Кроме того, была отмечена активация *NOTCH1* в комбинации ПВЭК/МКСч в ответ на индукцию NOTCH, усиливая представление о тканеспецифичном ответе. Эти результаты свидетельствуют о потенциальном влиянии взаимодействия клеточного типа и порядка посева на модуляцию экспрессии маркеров и сигнальных путей.

Было отмечено снижение экспрессии маркеров эндоМП, таких как *SNAIL* и *SNAI2* в кокультуре МКСч/ПВЭК по сравнению с монокультурой МКСч в ответ на индукцию BMP2, что было подтверждено отсутствием синтеза α -SMA при иммуноцитохимическом окрашивании. Это может означать, что добавление культуры ПВЭК, которая ранее не синтезировала α -SMA в монокультуре, препятствовало проявлению маркера в культуре МКСч. В то же время двойная трансдукция привела к значительному увеличению экспрессии *BMP2* в кокультуре МКСч/ПВЭК по сравнению с одиночной индукцией, что может указывать на дополнительный эффект при наличии обоих факторов в кокультуре. Напротив, в кокультуре ПВЭК/МКСч двойная трансдукция положительно повлияла на накопление α -SMA и увеличила экспрессию *SNAI2*. Во время эксперимента неоднократно наблюдалось, что экспрессия *SNAI2* напрямую коррелирует с синтезом α -SMA в культурах в ответ на активацию Notch или BMP2.

BMP2, как и Notch, играет важную роль в изменении экспрессии генов маркеров эндоМП и компонентов сигнальных путей Notch и Bmp, и, по-видимому, способствует дерегуляции Notch, возможно, через Slug-зависимый механизм (*SNAI2*). Тем не менее, полученные результаты показали, что в МКСч, так и в ПВЭК имеется взаимосвязь, которая изменяется во время совместного культивирования, что приводит к формированию антагонистических эффектов в экспрессии генов, которые сопоставимы при выборе судьбы клеток между развивающимися

тканями.

Противоположный клеточный ответ, наблюдаемый при совместном культивировании МКСч и ПВЭК в различных комбинациях, можно отнести к сложному взаимодействию между типами клеток и задействованными сигнальными механизмами (**Рисунок 43**). В одном исследовании, где эндотелиальные клетки культивируются совместно с мезенхимными стволовыми клетками (МСК), было обнаружено, что эндотелиальные клетки индуцируют дифференцировку гладких мышечных клеток (ГМК) в МСК [228]. Эта индукция ГМК была опосредована сигнальным путём Notch и была независима от сигнального пути с факторами роста. С другой стороны, там, где эндотелиальные клетки культивируются совместно со стволовыми клетками костного мозга (КМСК), происходила индукция как остеогенеза, так и ангиогенеза [229]. Сокультурированные клетки продемонстрировали повышенную экспрессию остеогенных генов, что свидетельствует о поддерживающей роли эндотелиальных клеток в содействии как образованию костей, так и образованию кровеносных сосудов. Эти результаты свидетельствуют о том, что конкретная комбинация типов клеток и их микросреда может влиять на клеточный ответ и определение судьбы, подчеркивая важность взаимодействия различных типов клеток в зависимости от контекста.

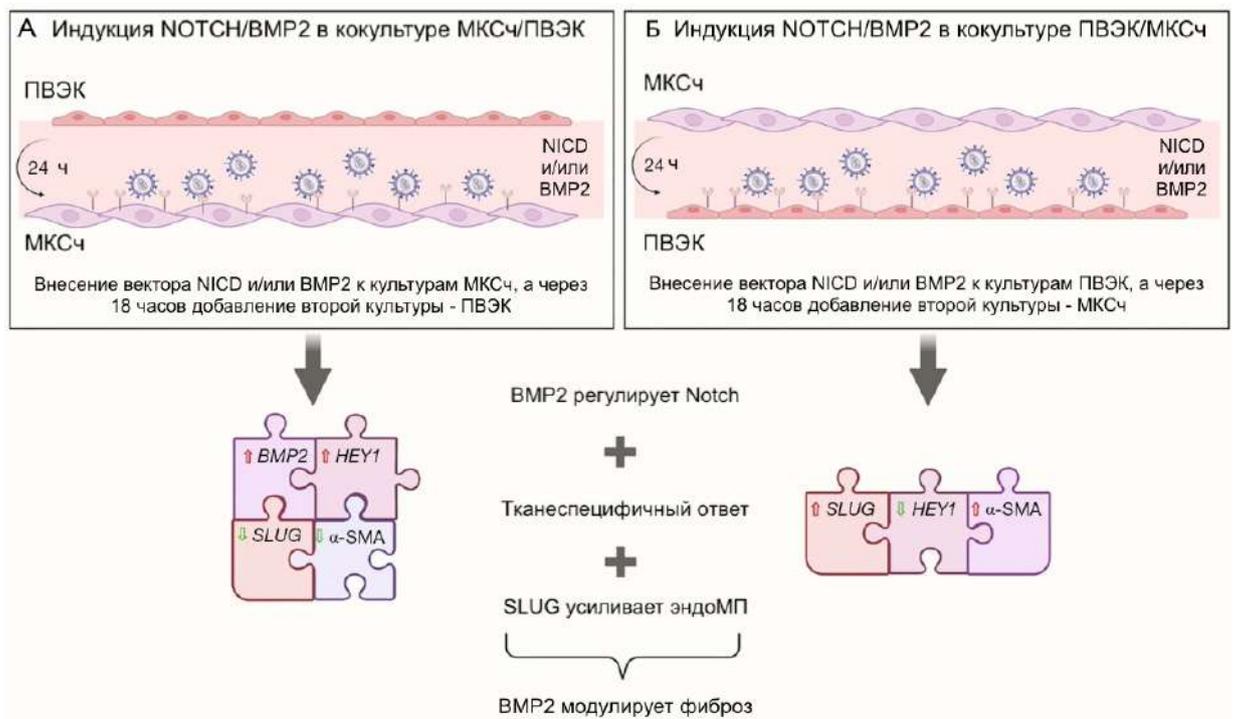


Рисунок 44. Схема, показывающая влияние активации сигнальных путей Notch и BMP2 на изменение клеточных эффектов в зависимости от метода совместного культивирования МКСч и ПВЭК. BMP2, костный морфогенетический белок 2; МКСч, мезенхимные клетки сердца

человека; ПВЭК, эндотелиальные клетки пупочной вены человека; NICD, внутриклеточный домен NOTCH1 [25].

Несмотря на то, что в клеточных культурах были отмечены маркеры эндоМП в виде экспрессии ряда генов и накопление α -SMA, более широкий спектр маркеров не был рассмотрен, что позволило бы расширить работу, например, с помощью оценивания эндотелиальных маркеров, таких как кадгерин эндотелия сосудов, эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) и/или CD31; и мезенхимных специфических маркеров, таких как N-кадгерин, FSP-1, виментин и/или фибронектин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Восстановление сократительной функции сердца и регенерация миокарда после ишемического повреждения являются актуальными проблемами регенеративной медицины и клеточной биологии. Традиционные методы лечения, такие как лекарственная терапия и реваскуляризация, только купируют симптомы, но не способствуют полному выздоровлению от развивающейся сердечной недостаточности. Открытие и экспериментальное использование мезенхимных клеток сердца стало новым витком в сердечно-сосудистой регенеративной медицине, а проведение клинических испытаний с использованием данных клеток и их продуктов вселило надежду на появление новой формы терапии сердечной недостаточности (рисунок 45).

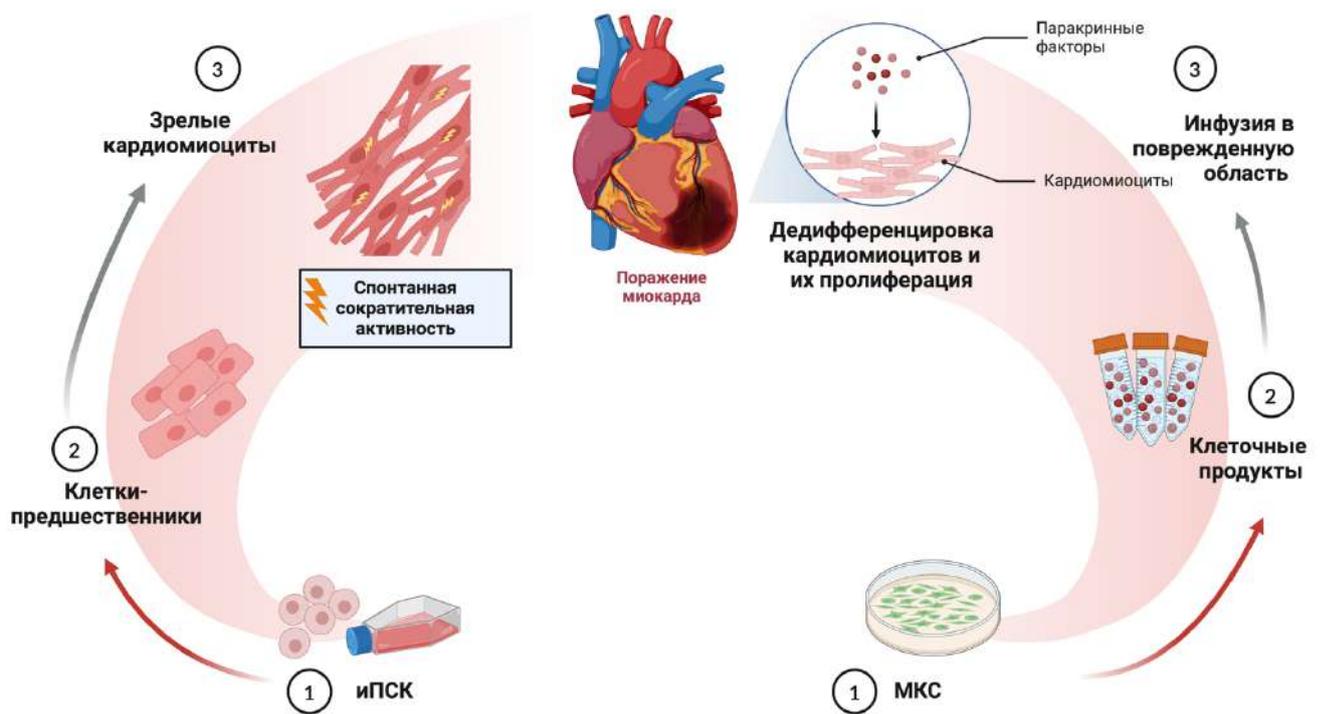


Рисунок 45. Возможные подходы в восстановительной терапии миокарда [29].

Результаты настоящего исследования показали, что острый гипоксический стресс может вызывать кратковременную активацию эмбриональных сигнальных путей Notch и Wnt в мезенхимных клетках сердца, и это взаимодействие тесно связано с процессами раннего ремоделирования миокарда после инфаркта. Способность правильно модулировать и

контролировать соответствующие сигналы в сердце может способствовать повышению регенеративной способности миокарда до формирования фиброзных состояний.

Наше исследование подчеркивает важность уровня активации Notch в МКСч от пациентов с диагнозом тетрада Фалло. Сложный генетический фон может быть ассоциирован с передачей сигналов Notch как с очень чувствительным и точно настроенным регулирующим компонентом целостности ткани. В результате, нарушение регуляции экспрессии генов, связанных с Notch, вызывает поломку сложного и сбалансированного механизма регуляции, и это в целом может приводить к дефектам развития, не обязательно связанным с мутациями в генах, ассоциированных с Notch.

В результате наших исследований в соответствии с поставленными задачами были сделаны следующие **выводы**:

1. Инфаркт миокарда приводит к значительному изменению паттерна транскрипции генов в постинфарктных тканях через 24 часа после острого инфаркта, и способствует активации компонентов сигнального пути Notch и *Bmp2/Runx2*.
2. Инфаркт миокарда оказывает стимулирующее воздействие на популяции резидентных мезенхимных клеток сердца в зоне повреждения в виде усиленной их способности к пролиферации, миграции и дифференцировке *in vitro*.
3. Транскрипционный профиль постинфарктных мезенхимных клеток сердца отличается от здоровых клеток по экспрессии компонентов сигнального пути Notch (*Jag1*, *Hes1*) и *Bmp2/Runx2*.
4. Гипоксия *in vitro* активирует сигнальные пути Notch и BMP2 в мезенхимных клетках сердца человека и крыс.
5. Активация Notch в мезенхимных клетках сердца крысы и человека приводит к дозозависимому изменению экспрессии компонентов сигнального пути Notch, и не влияет на экспрессию BMP2.
6. Уровни активации сигнального пути Notch влияют на выраженность пролиферативных и дифференцировочных процессов в мезенхимных клетках сердца человека, а дозозависимая активация Notch усиливает их способность к дифференцировке в кардиогенном направлении.
7. Попеременная активация Notch и BMP2 влияет на экспрессию генов-маркеров эндотелиально-мезенхимного перехода и синтез альфа-актина, и способствует активации мезенхимных клеток сердца человека.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- Bmp2* — ген костного морфогенетического протеина 2
- CI — индекса ячейки
- CSL – CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1 (фактор транскрипции, который отвечает за активацию Notch генов)
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол
- DMEM – питательная среда Игла в модификации Дульбекко
- Fabp4* — Fatty acid binding protein 4
- MAML1 — Mastermind-like transcriptional co-activator 1
- NICD — Notch intracellular domain
- PEI – polyethylenimine hydrochloride
- Runx2* — Runt-related transcription factor 2
- Tnnt2* — ген тропонина T2
- АВК – атриовентрикулярный канал
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ДМСО (диметилсульфоксид) – криопротектор
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДП-МКСч - мезенхимные клетки сердца, полученные от пациентов с дефектом межжелудочковой перегородки
- ЗМ-МКСк — мезенхимные клетки из здорового участка миокарда ишемизированного сердца
- ИМ-МКСк — мезенхимные клетки сердца из постинфарктной области
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- КМЦ – кардиомиоциты
- ЛО-МКСк — мезенхимные клетки сердца из здорового миокарда ложнопериорированных крыс
- ЛС – лошадиная сыворотка
- МКСк - мезенхимные клетки сердца крысы
- МКСч – мезенхимные клетки сердца человека
- НФБ — натрий-фосфатный буферный раствор
- ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с проведением обратной транскрипции
- ПФА – параформальдегид
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ТФ-МКСч - мезенхимные клетки сердца, полученные от пациентов с тетрадой Фалло
- ФБС – фетальная бычья сыворотка

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Z., Lin L., Wu H., Yan L., Wang H., Yang H., Li H. Global, Regional, and National Death, and Disability-Adjusted Life-Years (DALYs) for Cardiovascular Disease in 2017 and Trends and Risk Analysis From 1990 to 2017 Using the Global Burden of Disease Study and Implications for Prevention // *Front Public Health*. – 2021. – Т. 9. – С. 559751.
2. Emmons-Bell S., Johnson C., Roth G. Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review // *Heart*. – 2022. – Т. 108, № 17. – С. 1351-1360.
3. WHO. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. – 2023. – URL: <https://www.who.int/publications/book-orders>.
4. Blagova O. V., Nedostup A. V. Classification of Non-Coronary Heart Diseases. Point of View // *Russian Journal of Cardiology*. – 2017.10.15829/1560-4071-2017-2-7-21 № 2. – С. 7-21.
5. van der Ven J. P. G., van den Bosch E., Bogers A., Helbing W. A. Current outcomes and treatment of tetralogy of Fallot // *F1000Res*. – 2019. – Т. 8.
6. Abumehdi M., Sasikumar D., Chaudhari M., Bhole V., Botha P., Mehta C., Stumper O. Stenting of the right ventricular outflow tract as an initial intervention in Tetralogy of Fallot with pulmonary stenosis and major aortopulmonary collateral arteries // *Cardiol Young*. – 2021. – Т. 31, № 3. – С. 452-459.
7. Manshaei R., Merico D., Reuter M. S., Engchuan W., Mojarad B. A., Chaturvedi R., Heung T., Pellecchia G., Zarrei M., Nalpathamkalam T., Khan R., Okello J. B. A., Liston E., Curtis M., Yuen R. K. C., Marshall C. R., Jobling R. K., Oechslin E., Wald R. M., Silversides C. K., Scherer S. W., Kim R. H., Bassett A. S. Genes and Pathways Implicated in Tetralogy of Fallot Revealed by Ultra-Rare Variant Burden Analysis in 231 Genome Sequences // *Front Genet*. – 2020. – Т. 11. – С. 957.
8. Reed G. W., Rossi J. E., Cannon C. P. Acute myocardial infarction // *Lancet*. – 2017. – Т. 389, № 10065. – С. 197-210.
9. Vagnozzi R. J., Maillet M., Sargent M. A., Khalil H., Johansen A. K. Z., Schwanekamp J. A., York A. J., Huang V., Nahrendorf M., Sadayappan S., Molkentin J. D. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy // *Nature*. – 2020. – Т. 577, № 7790. – С. 405-409.
10. Du W. W., Xu J., Yang W., Wu N., Li F., Zhou L., Wang S., Li X., He A. T., Du K. Y., Zeng K., Ma J., Lyu J., Zhang C., Zhou C., Maksimovic K., Yang B. B. A Neuroigin Isoform Translated by circNlgn Contributes to Cardiac Remodeling // *Circ Res*. – 2021. – Т. 129, № 5. – С. 568-582.
11. Groenewegen A., Rutten F. H., Mosterd A., Hoes A. W. Epidemiology of heart failure // *Eur J Heart Fail*. – 2020. – Т. 22, № 8. – С. 1342-1356.
12. Stehlik J., Kobashigawa J., Hunt S. A., Reichenspurner H., Kirklin J. K. Honoring 50 Years of Clinical Heart Transplantation in Circulation: In-Depth State-of-the-Art Review // *Circulation*. – 2018. – Т. 137, № 1. – С. 71-87.
13. Behfar A., Crespo-Diaz R., Terzic A., Gersh B. J. Cell therapy for cardiac repair--lessons from clinical trials // *Nat Rev Cardiol*. – 2014. – Т. 11, № 4. – С. 232-46.
14. Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell*. – 2003. – Т. 114, № 6. – С. 763-76.
15. Hsieh P. C., Segers V. F., Davis M. E., MacGillivray C., Gannon J., Molkentin J. D., Robbins J., Lee R. T. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury // *Nat Med*. – 2007. – Т. 13, № 8. – С. 970-4.
16. Mehanna R. A., Essawy M. M., Barkat M. A., Awaad A. K., Thabet E. H., Hamed H. A., Elkafrawy H., Khalil N. A., Sallam A., Kholief M. A., Ibrahim S. S., Mourad G. M. Cardiac stem cells: Current knowledge and future prospects // *World J Stem Cells*. – 2022. – Т. 14, № 1. – С. 1-40.
17. Eschenhagen T., Bolli R., Braun T., Field L. J., Fleischmann B. K., Frisen J., Giacca M., Hare J. M., Houser S., Lee R. T., Marban E., Martin J. F., Molkentin J. D., Murry C. E., Riley P. R., Ruiz-

- Lozano P., Sadek H. A., Sussman M. A., Hill J. A. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement // *Circulation*. – 2017. – T. 136, № 7. – C. 680-686.
18. Ghodrati S., Hoseini S. J., Asadpour S., Nazarnezhad S., Alizadeh Eghtedar F., Kargozar S. Stem cell-based therapies for cardiac diseases: The critical role of angiogenic exosomes // *Biofactors*. – 2021. – T. 47, № 3. – C. 270-291.
19. Belien H., Evens L., Hendrikx M., Bito V., Bronckaers A. Combining stem cells in myocardial infarction: The road to superior repair? // *Med Res Rev*. – 2022. – T. 42, № 1. – C. 343-373.
20. Nemir M., Kay M., Maison D., Berthonneche C., Sarre A., Plaisance I., Pedrazzini T. Inhibition of the NOTCH1 Pathway in the Stressed Heart Limits Fibrosis and Promotes Recruitment of Non-Myocyte Cells into the Cardiomyocyte Fate // *J Cardiovasc Dev Dis*. – 2022. – T. 9, № 4.
21. Xiao C., Hou J., Wang F., Song Y., Zheng J., Luo L., Wang J., Ding W., Zhu X., Xiong J. W. Endothelial Brg1 fine-tunes Notch signaling during zebrafish heart regeneration // *NPJ Regen Med*. – 2023. – T. 8, № 1. – C. 21.
22. Nakada Y., Canseco D. C., Thet S., Abdisalaam S., Asaithamby A., Santos C. X., Shah A. M., Zhang H., Faber J. E., Kinter M. T., Szweda L. I., Xing C., Hu Z., Deberardinis R. J., Schiattarella G., Hill J. A., Oz O., Lu Z., Zhang C. C., Kimura W., Sadek H. A. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice // *Nature*. – 2017. – T. 541, № 7636. – C. 222-227.
23. Docshin P. M., Karpov A. A., Mametov M. V., Ivkin D. Y., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. Mechanisms of Regenerative Potential Activation in Cardiac Mesenchymal Cells // *Biomedicines*. – 2022. – T. 10, № 6.
24. Docshin P. M., Karpov A. A., Eyvazova S. D., Puzanov M. V., Kostareva A. A., Galagudza M. M., Malashicheva A. B. Activation of Cardiac Stem Cells in Myocardial Infarction // *Cell and Tissue Biology*. – 2018. – T. 12, № 3. – C. 175-182.
25. Docshin P., Bairqdar A., Malashicheva A. Interplay between BMP2 and Notch signaling in endothelial-mesenchymal transition: implications for cardiac fibrosis // *Stem Cell Investig*. – 2023. – T. 10. – C. 18.
26. Kozyrev I., Dokshin P., Kostina A., Kiselev A., Ignatieva E., Golovkin A., Pervunina T., Grekhov E., Gordeev M., Kostareva A., Malashicheva A. Dysregulation of Notch signaling in cardiac mesenchymal cells of patients with tetralogy of Fallot // *Pediatr Res*. – 2020. – T. 88, № 1. – C. 38-47.
27. Kozyrev I. A., Golovkin A. S., Ignatieva E. S., Dokshin P. M., Grekhov E. V., Gordeev M. L., Pervunina T. M., Kostareva A. A., Malashicheva A. B. Characterization of mesenchymal heart cells obtained from patients with tetralogy of Fallot and ventricular septal defect // *Translational Medicine*. – 2019. – T. 6, № 5. – C. 16-23.
28. Docshin P. M., Bairqdar A., Malashicheva A. B. Current status, challenges and perspectives of mesenchymal stem cell-based therapy for cardiac regeneration // *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. – 2021. – T. 10, № 3. – C. 72-78.
29. Dokshin P. M., Malashicheva A. B. Heart stem cells: hope or myth? // *Russian Journal of Cardiology*. – 2021. – T. 26, № 10.
30. *Developmental Biology*. / Barresi M., Gilbert, S. – Thirteenth Edition изд., 2023.
31. Zhang Q., Carlin D., Zhu F., Cattaneo P., Ideker T., Evans S. M., Bloomekatz J., Chi N. C. Unveiling Complexity and Multipotentiality of Early Heart Fields // *Circ Res*. – 2021. – T. 129, № 4. – C. 474-487.
32. Meilhac S. M., Buckingham M. E. The deployment of cell lineages that form the mammalian heart // *Nat Rev Cardiol*. – 2018. – T. 15, № 11. – C. 705-724.
33. Pelullo M., Zema S., Nardoza F., Checquolo S., Screpanti I., Bellavia D. Wnt, Notch, and TGF-beta Pathways Impinge on Hedgehog Signaling Complexity: An Open Window on Cancer // *Front Genet*. – 2019. – T. 10. – C. 711.
34. Li X., Yan X., Wang Y., Kaur B., Han H., Yu J. The Notch signaling pathway: a potential target for cancer immunotherapy // *J Hematol Oncol*. – 2023. – T. 16, № 1. – C. 45.
35. Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K., Chu Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics // *Signal Transduct Target Ther*. – 2022. – T. 7, № 1. – C. 95.

36. Oswald F., Kovall R. A. CSL-Associated Corepressor and Coactivator Complexes // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – T. 1066. – C. 279-295.
37. L Hernandez S., Cuervo H., J Kandel J., Flores-Guzman F., Garcia T., Hahn P., Kirschner R., M Defnet A., Bagrodia N., Nelson M., Biermann H., Shen S., L Wu L. The long and winding road: detecting and quantifying Notch activation in endothelial cells // *Vascular Cell.* – 2021. – T. 13, № 1.
38. Sjoqvist M., Andersson E. R. Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate // *Dev Biol.* – 2019. – T. 447, № 1. – C. 58-70.
39. Binshtok U., Sprinzak D. Modeling the Notch Response // *Adv Exp Med Biol.* – 2018. – T. 1066. – C. 79-98.
40. Hirano K. I., Hosokawa H., Yahata T., Ando K., Tanaka M., Imai J., Yazawa M., Ohtsuka M., Negishi N., Habu S., Sato T., Hozumi K. Dll1 Can Function as a Ligand of Notch1 and Notch2 in the Thymic Epithelium // *Front Immunol.* – 2022. – T. 13. – C. 852427.
41. Wu X., Yao J., Wang L., Zhang D., Zhang L., Reynolds E. X., Yu T., Bostrom K. I., Yao Y. Crosstalk between BMP and Notch Induces Sox2 in Cerebral Endothelial Cells // *Cells.* – 2019. – T. 8, № 6.
42. Kiyokawa H., Morimoto M. Notch signaling in the mammalian respiratory system, specifically the trachea and lungs, in development, homeostasis, regeneration, and disease // *Dev Growth Differ.* – 2020. – T. 62, № 1. – C. 67-79.
43. Ho D. M., Artavanis-Tsakonas S., Louvi A. The Notch pathway in CNS homeostasis and neurodegeneration // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* – 2020. – T. 9, № 1. – C. e358.
44. Moore R., Alexandre P. Delta-Notch Signaling: The Long and The Short of a Neuron's Influence on Progenitor Fates // *J Dev Biol.* – 2020. – T. 8, № 2.
45. Mukherjee M., Fogarty E., Janga M., Surendran K. Notch Signaling in Kidney Development, Maintenance, and Disease // *Biomolecules.* – 2019. – T. 9, № 11.
46. Yu J., Canalis E. Notch and the regulation of osteoclast differentiation and function // *Bone.* – 2020. – T. 138. – C. 115474.
47. Yoshioka H., Yamada T., Hasegawa S., Miyachi K., Ishii Y., Hasebe Y., Inoue Y., Tanaka H., Iwata Y., Arima M., Sugiura K., Akamatsu H. Senescent cell removal via JAG1-NOTCH1 signalling in the epidermis // *Exp Dermatol.* – 2021. – T. 30, № 9. – C. 1268-1278.
48. Wang X., Liu Y., He J., Wang J., Chen X., Yang R. Regulation of signaling pathways in hair follicle stem cells // *Burns Trauma.* – 2022. – T. 10. – C. tkac022.
49. Brown R. M., 2nd, Nelson J. C., Zhang H., Kiernan A. E., Groves A. K. Notch-mediated lateral induction is necessary to maintain vestibular prosensory identity during inner ear development // *Dev Biol.* – 2020. – T. 462, № 1. – C. 74-84.
50. Misiorek J. O., Przybyszewska-Podstawka A., Kalafut J., Paziewska B., Rolle K., Rivero-Muller A., Nees M. Context Matters: NOTCH Signatures and Pathway in Cancer Progression and Metastasis // *Cells.* – 2021. – T. 10, № 1.
51. Luxan G., D'Amato G., de la Pompa J. L. Intercellular Signaling in Cardiac Development and Disease: The NOTCH pathway // *Etiology and Morphogenesis of Congenital Heart Disease: From Gene Function and Cellular Interaction to Morphology / Nakanishi T. и др.* – Tokyo: Springer, 2016. – C. 103-14.
52. Seya D., Ihara D., Shirai M., Kawamura T., Watanabe Y., Nakagawa O. A role of Hey2 transcription factor for right ventricle development through regulation of Tbx2-Mycn pathway during cardiac morphogenesis // *Dev Growth Differ.* – 2021. – T. 63, № 1. – C. 82-92.
53. Ihara D., Watanabe Y., Seya D., Arai Y., Isomoto Y., Nakano A., Kubo A., Ogura T., Kawamura T., Nakagawa O. Expression of Hey2 transcription factor in the early embryonic ventricles is controlled through a distal enhancer by Tbx20 and Gata transcription factors // *Dev Biol.* – 2020. – T. 461, № 2. – C. 124-131.
54. Luxan G., D'Amato G., MacGrogan D., de la Pompa J. L. Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease // *Circ Res.* – 2016. – T. 118, № 1. – C. e1-e18.

55. Stankunas K., Ma G. K., Kuhnert F. J., Kuo C. J., Chang C. P. VEGF signaling has distinct spatiotemporal roles during heart valve development // *Dev Biol.* – 2010. – T. 347, № 2. – C. 325-36.
56. MacGrogan D., Munch J., de la Pompa J. L. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration // *Nat Rev Cardiol.* – 2018. – T. 15, № 11. – C. 685-704.
57. D'Amato G., Luxan G., de la Pompa J. L. Notch signalling in ventricular chamber development and cardiomyopathy // *FEBS J.* – 2016. – T. 283, № 23. – C. 4223-4237.
58. Samsa L. A., Givens C., Tzima E., Stainier D. Y., Qian L., Liu J. Cardiac contraction activates endocardial Notch signaling to modulate chamber maturation in zebrafish // *Development.* – 2015. – T. 142, № 23. – C. 4080-91.
59. Ribatti D. Role of notch and notch ligands // *New Insights on the Development of the Vascular System, 2022.* – C. 41-44.
60. James A. C., Szot J. O., Iyer K., Major J. A., Pursglove S. E., Chapman G., Dunwoodie S. L. Notch4 reveals a novel mechanism regulating Notch signal transduction // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – T. 1843, № 7. – C. 1272-84.
61. Breikaa R. M., Denman K., Ueyama Y., McCallinhart P. E., Khan A. Q., Agarwal G., Trask A. J., Garg V., Lilly B. Loss of Jagged1 in mature endothelial cells causes vascular dysfunction with alterations in smooth muscle phenotypes // *Vascul Pharmacol.* – 2022. – T. 145. – C. 107087.
62. Wolf K., Hu H., Isaji T., Dardik A. Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics // *J Vasc Surg.* – 2019. – T. 69, № 1. – C. 253-262.
63. Lahm H., Schon P., Doppler S., Dressen M., Cleuziou J., Deutsch M. A., Ewert P., Lange R., Krane M. Tetralogy of Fallot and Hypoplastic Left Heart Syndrome - Complex Clinical Phenotypes Meet Complex Genetic Networks // *Curr Genomics.* – 2015. – T. 16, № 3. – C. 141-58.
64. Pradegan N., Vida V. L., Geva T., Stellin G., White M. T., Sanders S. P., Padera R. F. Myocardial histopathology in late-repaired and unrepaired adults with tetralogy of Fallot // *Cardiovasc Pathol.* – 2016. – T. 25, № 3. – C. 225-231.
65. Bailliard F., Anderson R. H. Tetralogy of fallot // *Orphanet Journal of Rare Diseases.* – 2009. – T. 4, № 1. – C. 2.
66. Mercer-Rosa L., Paridon S. M., Fogel M. A., Rychik J., Tanel R. E., Zhao H., Zhang X., Yang W., Shults J., Goldmuntz E. 22q11.2 deletion status and disease burden in children and adolescents with tetralogy of Fallot // *Circulation: Genomic and Precision Medicine.* – 2015. – C. CIRCGENETICS. 114.000819.
67. Topf A., Griffin H. R., Glen E., Soemedi R., Brown D. L., Hall D., Rahman T. J., Eloranta J. J., Jungst C., Stuart A. G., O'Sullivan J., Keavney B. D., Goodship J. A. Functionally significant, rare transcription factor variants in tetralogy of Fallot // *PLoS One.* – 2014. – T. 9, № 8. – C. e95453.
68. Morgenthau A., Frishman W. H. Genetic Origins of Tetralogy of Fallot // *Cardiol Rev.* – 2018. – T. 26, № 2. – C. 86-92.
69. Diab N. S., Barish S., Dong W., Zhao S., Allington G., Yu X., Kahle K. T., Brueckner M., Jin S. C. Molecular Genetics and Complex Inheritance of Congenital Heart Disease // *Genes (Basel).* – 2021. – T. 12, № 7.
70. Shabana N. A., Shahid S. U., Irfan U. Genetic Contribution to Congenital Heart Disease (CHD) // *Pediatr Cardiol.* – 2020. – T. 41, № 1. – C. 12-23.
71. Greenway S. C., Pereira A. C., Lin J. C., DePalma S. R., Israel S. J., Mesquita S. M., Ergul E., Conta J. H., Korn J. M., McCarroll S. A., Gorham J. M., Gabriel S., Altshuler D. M., de Lourdes Quintanilla-Dieck M., Artunduaga M. A., Eavey R. D., Plenge R. M., Shadick N. A., Weinblatt M. E., De Jager P. L., Hafler D. A., Breitbart R. E., Seidman J. G., Seidman C. E. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot // *Nature Genetics.* – 2009. – T. 41. – C. 931.
72. Bittel D. C., Butler M. G., Kibiryeveva N., Marshall J. A., Chen J., Lofland G. K., O'Brien J. E. Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects // *BMC medical genomics.* – 2011. – T. 4, № 1. – C. 1.

73. Monaghan R. M., Page D. J., Ostergaard P., Keavney B. D. The physiological and pathological functions of VEGFR3 in cardiac and lymphatic development and related diseases // *Cardiovasc Res.* – 2021. – T. 117, № 8. – C. 1877-1890.
74. Page D. J., Miossec M. J., Williams S. G., Monaghan R. M., Fotiou E., Cordell H. J., Sutcliffe L., Topf A., Bourgey M., Bourque G., Eveleigh R., Dunwoodie S. L., Winlaw D. S., Bhattacharya S., Breckpot J., Devriendt K., Gewillig M., Brook J. D., Setchfield K. J., Bu'Lock F. A., O'Sullivan J., Stuart G., Bezzina C. R., Mulder B. J. M., Postma A. V., Bentham J. R., Baron M., Bhaskar S. S., Black G. C., Newman W. G., Hentges K. E., Lathrop G. M., Santibanez-Koref M., Keavney B. D. Whole Exome Sequencing Reveals the Major Genetic Contributors to Nonsyndromic Tetralogy of Fallot // *Circ Res.* – 2019. – T. 124, № 4. – C. 553-563.
75. Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure // *Circ Res.* – 2003. – T. 92, № 2. – C. 139-50.
76. Uygur A., Lee R. T. Mechanisms of Cardiac Regeneration // *Dev Cell.* – 2016. – T. 36, № 4. – C. 362-74.
77. Growth Hyperplasia Card Muscle. / Romyantsev P. P. – 1st Edition изд. – London, 2017.
78. Bergmann O. Clearing up the mist: cardiomyocyte renewal in human hearts // *Eur Heart J.* – 2019. – T. 40, № 13. – C. 1037-1038.
79. Senyo S. E., Steinhauser M. L., Pizzimenti C. L., Yang V. K., Cai L., Wang M., Wu T. D., Guerquin-Kern J. L., Lechene C. P., Lee R. T. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes // *Nature.* – 2013. – T. 493, № 7432. – C. 433-6.
80. Porrello E. R., Mahmoud A. I., Simpson E., Hill J. A., Richardson J. A., Olson E. N., Sadek H. A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart // *Science.* – 2011. – T. 331, № 6020. – C. 1078-80.
81. Mahmoud A. I., Porrello E. R., Kimura W., Olson E. N., Sadek H. A. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice // *Nat Protoc.* – 2014. – T. 9, № 2. – C. 305-11.
82. Aurora A. B., Porrello E. R., Tan W., Mahmoud A. I., Hill J. A., Bassel-Duby R., Sadek H. A., Olson E. N. Macrophages are required for neonatal heart regeneration // *J Clin Invest.* – 2014. – T. 124, № 3. – C. 1382-92.
83. Haubner B. J., Schneider J., Schweigmann U., Schuetz T., Dichtl W., Velik-Salchner C., Stein J. I., Penninger J. M. Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction // *Circ Res.* – 2016. – T. 118, № 2. – C. 216-21.
84. Soonpaa M. H., Rubart M., Field L. J. Challenges measuring cardiomyocyte renewal // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – T. 1833, № 4. – C. 799-803.
85. Leri A., Kajstura J., Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration // *Physiol Rev.* – 2005. – T. 85, № 4. – C. 1373-416.
86. Windmueller R., Leach J. P., Babu A., Zhou S., Morley M. P., Wakabayashi A., Petrenko N. B., Viatour P., Morrissey E. E. Direct Comparison of Mononucleated and Binucleated Cardiomyocytes Reveals Molecular Mechanisms Underlying Distinct Proliferative Competencies // *Cell Rep.* – 2020. – T. 30, № 9. – C. 3105-3116 e4.
87. Galow A. M., Wolfien M., Muller P., Bartsch M., Brunner R. M., Hoeflich A., Wolkenhauer O., David R., Goldammer T. Integrative Cluster Analysis of Whole Hearts Reveals Proliferative Cardiomyocytes in Adult Mice // *Cells.* – 2020. – T. 9, № 5.
88. Arjmand B., Abedi M., Arabi M., Alavi-Moghadam S., Rezaei-Tavirani M., Hadavandkhani M., Tayanloo-Beik A., Kordi R., Roudsari P. P., Larijani B. Regenerative Medicine for the Treatment of Ischemic Heart Disease; Status and Future Perspectives // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – T. 9. – C. 704903.
89. Jarrige M., Frank E., Herardot E., Martineau S., Darle A., Benabides M., Domingues S., Chose O., Habeler W., Lorant J., Baldeschi C., Martinat C., Monville C., Morizur L., Ben M'Barek K. The Future of Regenerative Medicine: Cell Therapy Using Pluripotent Stem Cells and Acellular Therapies Based on Extracellular Vesicles // *Cells.* – 2021. – T. 10, № 2.

90. Murry C. E., MacLellan W. R. Stem cells and the heart-the road ahead // *Science*. – 2020. – T. 367, № 6480. – C. 854-855.
91. Bhartiya D. Adult tissue-resident stem cells-fact or fiction? // *Stem Cell Res Ther*. – 2021. – T. 12, № 1. – C. 73.
92. Mannino G., Russo C., Maugeri G., Musumeci G., Vicario N., Tibullo D., Giuffrida R., Parenti R., Lo Furno D. Adult stem cell niches for tissue homeostasis // *J Cell Physiol*. – 2022. – T. 237, № 1. – C. 239-257.
93. Pinto A. R., Ilinykh A., Ivey M. J., Kuwabara J. T., D'Antoni M. L., Debuque R., Chandran A., Wang L., Arora K., Rosenthal N. A., Tallquist M. D. Revisiting Cardiac Cellular Composition // *Circ Res*. – 2016. – T. 118, № 3. – C. 400-9.
94. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium // *Nature*. – 2001. – T. 410, № 6829. – C. 701-5.
95. van Berlo J. H., Kanisicak O., Maillet M., Vagnozzi R. J., Karch J., Lin S. C., Middleton R. C., Marban E., Molkentin J. D. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart // *Nature*. – 2014. – T. 509, № 7500. – C. 337-41.
96. Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins R. W., Lecapitaine N., Cascapera S., Beltrami A. P., D'Alessandro D. A., Zias E., Quaini F., Urbanek K., Michler R. E., Bolli R., Kajstura J., Leri A., Anversa P. Human cardiac stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2007. – T. 104, № 35. – C. 14068-73.
97. Chong J. J., Yang X., Don C. W., Minami E., Liu Y. W., Weyers J. J., Mahoney W. M., Van Biber B., Cook S. M., Palpant N. J., Gantz J. A., Fugate J. A., Muskheli V., Gough G. M., Vogel K. W., Astley C. A., Hotchkiss C. E., Baldessari A., Pabon L., Reinecke H., Gill E. A., Nelson V., Kiem H. P., Laflamme M. A., Murry C. E. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts // *Nature*. – 2014. – T. 510, № 7504. – C. 273-7.
98. Keith M. C., Bolli R. "String theory" of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results // *Circ Res*. – 2015. – T. 116, № 7. – C. 1216-30.
99. Gude N. A., Sussman M. A. Cardiac regenerative therapy: Many paths to repair // *Trends Cardiovasc Med*. – 2020. – T. 30, № 6. – C. 338-343.
100. Le T., Chong J. Cardiac progenitor cells for heart repair // *Cell Death Discov*. – 2016. – T. 2. – C. 16052.
101. Santini M. P., Forte E., Harvey R. P., Kovacic J. C. Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells // *Development*. – 2016. – T. 143, № 8. – C. 1242-58.
102. Li M., Naqvi N., Yahiro E., Liu K., Powell P. C., Bradley W. E., Martin D. I., Graham R. M., Dell'Italia L. J., Husain A. c-kit is required for cardiomyocyte terminal differentiation // *Circ Res*. – 2008. – T. 102, № 6. – C. 677-85.
103. Zaruba M. M., Soonpaa M., Reuter S., Field L. J. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts // *Circulation*. – 2010. – T. 121, № 18. – C. 1992-2000.
104. Dergilev K., Tsokolaeva Z., Makarevich P., Beloglazova I., Zubkova E., Boldyreva M., Ratner E., Dyikanov 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. – T. 2018. – C. 3536854.
105. Zakharova L., Mastroeni D., Mutlu N., Molina M., Goldman S., Diethrich E., Gaballa M. A. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function // *Cardiovasc Res*. – 2010. – T. 87, № 1. – C. 40-9.
106. Tang X. L., Li Q., Rokosh G., Sanganalmath S. K., Chen N., Ou Q., Stowers H., Hunt G., Bolli R. Long-Term Outcome of Administration of c-kit(POS) Cardiac Progenitor Cells After Acute Myocardial Infarction: Transplanted Cells Do not Become Cardiomyocytes, but Structural and

- Functional Improvement and Proliferation of Endogenous Cells Persist for at Least One Year // *Circ Res.* – 2016. – T. 118, № 7. – C. 1091-105.
107. Bolli R., Mitrani R. D., Hare J. M., Pepine C. J., Perin E. C., Willerson J. T., Traverse J. H., Henry T. D., Yang P. C., Murphy M. P., March K. L., Schulman I. H., Ikram S., Lee D. P., O'Brien C., Lima J. A., Ostovaneh M. R., Ambale-Venkatesh B., Lewis G., Khan A., Bacallao K., Valasaki K., Longsomboon B., Gee A. P., Richman S., Taylor D. A., Lai D., Sayre S. L., Bettencourt J., Vojvodic R. W., Cohen M. L., Simpson L., Aguilar D., Loghin C., Moye L., Ebert R. F., Davis B. R., Simari R. D., Cardiovascular Cell Therapy Research N. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRN CONCERT-HF trial // *Eur J Heart Fail.* – 2021. – T. 23, № 4. – C. 661-674.
108. Chong J. J., Chandrakanthan V., Xaymardan M., Asli N. S., Li J., Ahmed I., Heffernan C., Menon M. K., Scarlett C. J., Rashidianfar A., Biben C., Zoellner H., Colvin E. K., Pimanda J. E., Biankin A. V., Zhou B., Pu W. T., Prall O. W., Harvey R. P. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin // *Cell Stem Cell.* – 2011. – T. 9, № 6. – C. 527-40.
109. Ball S. G., Worthington J. J., Canfield A. E., Merry C. L., Kielty C. M. Mesenchymal stromal cells: inhibiting PDGF receptors or depleting fibronectin induces mesodermal progenitors with endothelial potential // *Stem Cells.* – 2014. – T. 32, № 3. – C. 694-705.
110. Nosedá M., Harada M., McSweeney S., Leja T., Belian E., Stuckey D. J., Abreu Paiva M. S., Habib J., Macaulay I., de Smith A. J., al-Beidh F., Sampson R., Lumbers R. T., Rao P., Harding S. E., Blakemore A. I., Jacobsen S. E., Barahona M., Schneider M. D. PDGFR α demarcates the cardiogenic clonogenic Sca1⁺ stem/progenitor cell in adult murine myocardium // *Nat Commun.* – 2015. – T. 6. – C. 6930.
111. Cai C. L., Liang X., Shi Y., Chu P. H., Pfaff S. L., Chen J., Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart // *Dev Cell.* – 2003. – T. 5, № 6. – C. 877-89.
112. Laugwitz K. L., Moretti A., Caron L., Nakano A., Chien K. R. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? // *Development.* – 2008. – T. 135, № 2. – C. 193-205.
113. Menasché P., Vanneaux V., Hagege A., Bel A., Cholley B., Parouchev A., Cacciapuoti I., Al-Daccak R., Benhamouda N., Blons H., Agbulut O., Tosca L., Trouvin J. H., Fabreguettes J. R., Bellamy V., Charron D., Tartour E., Tachdjian G., Desnos M., Larghero J. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction // *J Am Coll Cardiol.* – 2018. – T. 71, № 4. – C. 429-438.
114. Smith R. R., Barile L., Cho H. C., Leppo M. K., Hare J. M., Messina E., Giacomello A., Abraham M. R., Marban E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens // *Circulation.* – 2007. – T. 115, № 7. – C. 896-908.
115. Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T. D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L. H., Behringer R. R., Garry D. J., Entman M. L., Schneider M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – T. 100, № 21. – C. 12313-8.
116. Li T. S., Cheng K., Lee S. T., Matsushita S., Davis D., Malliaras K., Zhang Y., Matsushita N., Smith R. R., Marban E. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair // *Stem Cells.* – 2010. – T. 28, № 11. – C. 2088-98.
117. Ye J., Boyle A. J., Shih H., Sievers R. E., Wang Z. E., Gormley M., Yeghiazarians Y. CD45-positive cells are not an essential component in cardiosphere formation // *Cell Tissue Res.* – 2013. – T. 351, № 1. – C. 201-5.
118. Malliaras K., Makkar R. R., Smith R. R., Cheng K., Wu E., Bonow R. O., Marban L., Mendizabal A., Cingolani E., Johnston P. V., Gerstenblith G., Schuleri K. H., Lardo A. C., Marban E. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUtologous

- stem Cells to reverse ventricular dysfunction) // *J Am Coll Cardiol.* – 2014. – T. 63, № 2. – С. 110-22.
119. Makkar R. R., Smith R. R., Cheng K., Malliaras K., Thomson L. E., Berman D., Czer L. S., Marban L., Mendizabal A., Johnston P. V., Russell S. D., Schuleri K. H., Lardo A. C., Gerstenblith G., Marban E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial // *Lancet.* – 2012. – T. 379, № 9819. – С. 895-904.
120. Makkar R. R., Kereiakes D. J., Aguirre F., Kowalchuk G., Chakravarty T., Malliaras K., Francis G. S., Povsic T. J., Schatz R., Traverse J. H., Pogoda J. M., Smith R. R., Marban L., Ascheim D. D., Ostovaneh M. R., Lima J. A. C., DeMaria A., Marban E., Henry T. D. Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration (ALLSTAR): a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial // *Eur Heart J.* – 2020. – T. 41, № 36. – С. 3451-3458.
121. 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. – T. 108, № 1. – С. 51-9.
122. Bartczak A., McGilvray I., Keating A. Mesenchymal stromal cell therapy to promote cardiac tissue regeneration and repair // *Curr Opin Organ Transplant.* – 2017. – T. 22, № 1. – С. 86-96.
123. Zhao L., Borikova A. L., Ben-Yair R., Guner-Ataman B., MacRae C. A., Lee R. T., Burns C. G., Burns C. E. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – T. 111, № 4. – С. 1403-8.
124. Pandey R., Yang, Y., Jackson, L., & Ahmed, R. . MicroRNAs regulating Meis1 expression and inducing cardiomyocyte proliferation // *Cardiovascular Regenerative Medicine.* – 2018. – T. 3.
125. Kovacic J. C., Mercader N., Torres M., Boehm M., Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease // *Circulation.* – 2012. – T. 125, № 14. – С. 1795-808.
126. Bischoff J. Endothelial-to-Mesenchymal Transition // *Circ Res.* – 2019. – T. 124, № 8. – С. 1163-1165.
127. Zhang J., Ogbu S. C., Musich P. R., Thewke D. P., Yao Z., Jiang Y. The Contribution of Endothelial-Mesenchymal Transition to Atherosclerosis // *International Journal of Translational Medicine.* – 2021. – T. 1, № 1. – С. 39-54.
128. Cheng W., Li X., Liu D., Cui C., Wang X. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Role in Cardiac Fibrosis // *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* – 2021. – T. 26, № 1. – С. 3-11.
129. Hanna A., Frangogiannis N. G. The Role of the TGF-beta Superfamily in Myocardial Infarction // *Front Cardiovasc Med.* – 2019. – T. 6. – С. 140.
130. Mocumbi A. O., Stothard J. R., Correia-de-Sa P., Yacoub M. Endomyocardial Fibrosis: an Update After 70 Years // *Curr Cardiol Rep.* – 2019. – T. 21, № 11. – С. 148.
131. Kachanova O., Lobov A., Malashicheva A. The Role of the Notch Signaling Pathway in Recovery of Cardiac Function after Myocardial Infarction // *Int J Mol Sci.* – 2022. – T. 23, № 20.
132. Kostina A. S., Uspensky Vcapital Ie C., Irtyuga O. B., Ignatieva E. V., Freylikhman O., Gavriiliuk N. D., Moiseeva O. M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva capital A C. A. C., Malashicheva A. B. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – T. 1862, № 4. – С. 733-740.
133. Mercado-Pimentel M. E., Runyan R. B. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart // *Cells Tissues Organs.* – 2007. – T. 185, № 1-3. – С. 146-56.
134. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. / Edition E. – 8 изд. – Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.
135. Karpov A. A., Ivkin, D. Yu., Dracheva, A. V., Pitukhina, N. N., Uspenskaya, Yu. K., Vaulina, D. D., et al. Rat model of post-infarct heart failure by left coronary artery occlusion: technical aspects, functional and morphological assessment // *Biomedicine.* – 2014. – T. 1. – С. 32-48.

136. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects // *JAMA*. – 2013. – Т. 310, № 20. – С. 2191-4.
137. Smits A. M., van Vliet P., Metz C. H., Korfage T., Sluijter J. P., Doevendans P. A., Goumans M. J. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // *Nat Protoc*. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 232-43.
138. Smits A. M., Van Vliet P., Metz C. H., Korfage T., Sluijter J. P., Doevendans P. A., Goumans M.-J. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology // *Nature protocols*. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 232-243.
139. Худяков А. А. К., Д.И.; Костарева, А.А.; Малашичева, А.Б. Получение предшественников кардиомиоцитов человека из ткани миокарда // *Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова*. – 2012. – Т. 18, № 1.
140. Dowling C. M., Herranz Ors C., Kiely P. A. Using real-time impedance-based assays to monitor the effects of fibroblast-derived media on the adhesion, proliferation, migration and invasion of colon cancer cells // *Biosci Rep*. – 2014. – Т. 34, № 4.
141. Костина Д. А. В. И. В., Смагина Л. В., Гаврилюк Н. Д., Моисеева О. М., Иртюга О. Б., Успенский В. Е., Костарева А. А., Малашичева А. Б. . Исследование функциональных свойств гладкомышечных клеток при аневризме аорты // *Цитология*. – 2013. – Т. 55, № 10. – С. 725-731.
142. Baudin B., Bruneel A., Bosselut N., Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells // *Nat Protoc*. – 2007. – Т. 2, № 3. – С. 481-5.
143. Kostina A., Shishkova A., Ignatieva E., Irtyuga O., Bogdanova M., Levchuk K., Golovkin A., Zhiduleva E., Uspenskiy V., Moiseeva O. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2018. – Т. 114. – С. 211-219.
144. Malashicheva A., Kanzler B., Tolkunova E., Trono D., Tomilin A. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations // *Genesis*. – 2007. – Т. 45, № 7. – С. 456-9.
145. Malashicheva A., Bogdanova M., Zibirnyk A., Smolina N., Ignatieva E., Freilikhman O., Fedorov A., Dmitrieva R., Sjoberg G., Sejersen T., Kostareva A. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner // *Mol Genet Metab*. – 2015. – Т. 115, № 2-3. – С. 118-27.
146. Dobin A., Davis C. A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics*. – 2013. – Т. 29, № 1. – С. 15-21.
147. Love M. I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol*. – 2014. – Т. 15, № 12. – С. 550.
148. Zenkova D., Kamenev, V., Sablina, R., Artyomov, M., and Sergushichev, A. Phantasmus: visual and interactive gene expression analysis // . – 2018.10.18129/B9.bioc.phantasmus.
149. Mabotuwana N. S., Rech L., Lim J., Hardy S. A., Murtha L. A., Rainer P. P., Boyle A. J. Paracrine Factors Released by Stem Cells of Mesenchymal Origin and their Effects in Cardiovascular Disease: A Systematic Review of Pre-clinical Studies // *Stem Cell Rev Rep*. – 2022. – Т. 18, № 8. – С. 2606-2628.
150. Silvestre J. S., Mallat Z. Editorial: Inflammation and Reparative Process After Cardiac Injury // *Front Cardiovasc Med*. – 2019. – Т. 6. – С. 162.
151. Ivan C., Hu W., Bottsford-Miller J., Zand B., Dalton H. J., Liu T., Huang J., Nick A. M., Lopez-Berestein G., Coleman R. L., Baggerly K. A., Sood A. K. Epigenetic analysis of the Notch superfamily in high-grade serous ovarian cancer // *Gynecol Oncol*. – 2013. – Т. 128, № 3. – С. 506-11.
152. Garg V., Muth A. N., Ransom J. F., Schluterman M. K., Barnes R., King I. N., Grossfeld P. D., Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease // *Nature*. – 2005. – Т. 437, № 7056. – С. 270-4.

153. Lavery K., Swain P., Falb D., Alaoui-Ismaili M. H. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells // *J Biol Chem.* – 2008. – T. 283, № 30. – C. 20948-58.
154. Seeherman H. J., Berasi S. P., Brown C. T., Martinez R. X., Juo Z. S., Jelinsky S., Cain M. J., Grode J., Tumelty K. E., Bohner M., Grinberg O., Orr N., Shoseyov O., Eyckmans J., Chen C., Morales P. R., Wilson C. G., Vanderploeg E. J., Wozney J. M. A BMP/activin A chimera is superior to native BMPs and induces bone repair in nonhuman primates when delivered in a composite matrix // *Sci Transl Med.* – 2019. – T. 11, № 489.
155. Tanaka K., Kaji H., Yamaguchi T., Kanazawa I., Canaff L., Hendy G. N., Sugimoto T. Involvement of the osteoinductive factors, Tmem119 and BMP-2, and the ER stress response PERK-eIF2 α -ATF4 pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells // *Calcif Tissue Int.* – 2014. – T. 94, № 4. – C. 454-64.
156. Viswanathan S., Shi Y., Galipeau J., Krampera M., Leblanc K., Martin I., Nolte J., Phinney D. G., Sensebe L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT(R)) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature // *Cytotherapy.* – 2019. – T. 21, № 10. – C. 1019-1024.
157. Epstein J. A. A Time to Press Reset and Regenerate Cardiac Stem Cell Biology // *JAMA Cardiol.* – 2019. – T. 4, № 2. – C. 95-96.
158. Sultana N., Zhang L., Yan J., Chen J., Cai W., Razzaque S., Jeong D., Sheng W., Bu L., Xu M., Huang G. Y., Hajjar R. J., Zhou B., Moon A., Cai C. L. Resident c-kit(+) cells in the heart are not cardiac stem cells // *Nat Commun.* – 2015. – T. 6. – C. 8701.
159. Oldershaw R., Owens W. A., Sutherland R., Linney M., Liddle R., Magana L., Lash G. E., Gill J. H., Richardson G., Meeson A. Human Cardiac-Mesenchymal Stem Cell-Like Cells, a Novel Cell Population with Therapeutic Potential // *Stem Cells Dev.* – 2019. – T. 28, № 9. – C. 593-607.
160. Golpanian S., Wolf A., Hatzistergos K. E., Hare J. M. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue // *Physiol Rev.* – 2016. – T. 96, № 3. – C. 1127-68.
161. Docshin P. M., Karpov A. A., Eyvazova S. D., Puzanov M. V., Kostareva A. A., Galagudza M. M., Malashicheva A. B. Activation of Cardiac Stem Cells in Myocardial Infarction // *Tsitologiya.* – 2018. – T. 60, № 2. – C. 81-88.
162. de Sena-Tomas C., Aleman A. G., Ford C., Varshney A., Yao D., Harrington J. K., Saude L., Ramalison M., Targoff K. L. Activation of Nkx2.5 transcriptional program is required for adult myocardial repair // *Nat Commun.* – 2022. – T. 13, № 1. – C. 2970.
163. Siatra P., Vatsellas G., Chatzianastasiou A., Balafas E., Manolakou T., Papapetropoulos A., Agapaki A., Mouchtouri E. T., Ruchaya P. J., Korovesi A. G., Mavroidis M., Thanos D., Beis D., Kokkinopoulos I. Return of the Tbx5; lineage-tracing reveals ventricular cardiomyocyte-like precursors in the injured adult mammalian heart // *NPJ Regen Med.* – 2023. – T. 8, № 1. – C. 13.
164. Sattler S., Campos Ramos G., Ludewig B., Rainer P. P. Cardioimmunology: the new frontier! // *Eur Heart J.* – 2023. – T. 44, № 26. – C. 2355-2357.
165. Kore R. A., Jenkins S. V., Jamshidi-Parsian A., Tackett A. J., Griffin R. J., Ayyadevara S., Mehta J. L. Proteomic analysis of transcription factors involved in the alteration of ischemic mouse heart as modulated by MSC exosomes // *Biochem Biophys Res.* – 2023. – T. 34. – C. 101463.
166. Kumar S., Shih C. M., Tsai L. W., Dubey R., Gupta D., Chakraborty T., Sharma N., Singh A. V., Swarup V., Singh H. N. Transcriptomic Profiling Unravels Novel Deregulated Gene Signatures Associated with Acute Myocardial Infarction: A Bioinformatics Approach // *Genes (Basel).* – 2022. – T. 13, № 12.
167. Martin-Bornez M., Falcon D., Morrugares R., Siegfried G., Khatib A. M., Rosado J. A., Galeano-Otero I., Smani T. New Insights into the Reparative Angiogenesis after Myocardial Infarction // *Int J Mol Sci.* – 2023. – T. 24, № 15.

168. Zheng Y., Lin J., Liu D., Wan G., Gu X., Ma J. Nogo-B promotes angiogenesis and improves cardiac repair after myocardial infarction via activating Notch1 signaling // *Cell Death Dis.* – 2022. – T. 13, № 4. – C. 306.
169. Gozlan O., Sprinzak D. Notch signaling in development and homeostasis // *Development.* – 2023. – T. 150, № 4.
170. Aquila G., Kostina A., Vieceli Dalla Sega F., Shlyakhto E., Kostareva A., Marracino L., Ferrari R., Rizzo P., Malaschicheva A. The Notch pathway: a novel therapeutic target for cardiovascular diseases? // *Expert Opin Ther Targets.* – 2019. – T. 23, № 8. – C. 695-710.
171. Santema B. T., Arita V. A., Sama I. E., Kloosterman M., van den Berg M. P., Nienhuis H. L. A., Van Gelder I. C., van der Meer P., Zannad F., Metra M., Ter Maaten J. M., Cleland J. G., Ng L. L., Anker S. D., Lang C. C., Samani N. J., Dickstein K., Filippatos G., van Veldhuisen D. J., Lam C. S. P., Rienstra M., Voors A. A. Pathophysiological pathways in patients with heart failure and atrial fibrillation // *Cardiovasc Res.* – 2022. – T. 118, № 11. – C. 2478-2487.
172. Ferrari R., Rizzo P. The Notch pathway: a novel target for myocardial remodelling therapy? // *Eur Heart J.* – 2014. – T. 35, № 32. – C. 2140-5.
173. Marracino L., Fortini F., Bouhamida E., Camponogara F., Severi P., Mazzoni E., Patergnani S., D'Aniello E., Campana R., Pinton P., Martini F., Tognon M., Campo G., Ferrari R., Vieceli Dalla Sega F., Rizzo P. Adding a "Notch" to Cardiovascular Disease Therapeutics: A MicroRNA-Based Approach // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – T. 9. – C. 695114.
174. Tavares A. L. P., Brown J. A., Ulrich E. C., Dvorak K., Runyan R. B. Runx2-I is an Early Regulator of Epithelial-Mesenchymal Cell Transition in the Chick Embryo // *Dev Dyn.* – 2018. – T. 247, № 3. – C. 542-554.
175. Bobos D., Soufla G., Angouras D. C., Lekakis I., Georgopoulos S., Melissari E. Investigation of the Role of BMP2 and -4 in ASD, VSD and Complex Congenital Heart Disease // *Diagnostics (Basel).* – 2023. – T. 13, № 16.
176. Edwards W., Greco T. M., Miner G. E., Barker N. K., Herring L., Cohen S., Cristea I. M., Conlon F. L. Quantitative proteomic profiling identifies global protein network dynamics in murine embryonic heart development // *Dev Cell.* – 2023. – T. 58, № 12. – C. 1087-1105 e4.
177. Ye D., Liu Y., Pan H., Feng Y., Lu X., Gan L., Wan J., Ye J. Insights into bone morphogenetic proteins in cardiovascular diseases // *Front Pharmacol.* – 2023. – T. 14. – C. 1125642.
178. Prados B., Gomez-Apinaniz P., Papoutsis T., Luxan G., Zaffran S., Perez-Pomares J. M., de la Pompa J. L. Myocardial Bmp2 gain causes ectopic EMT and promotes cardiomyocyte proliferation and immaturity // *Cell Death Dis.* – 2018. – T. 9, № 3. – C. 399.
179. Morrell N. W., Bloch D. B., ten Dijke P., Goumans M. J., Hata A., Smith J., Yu P. B., Bloch K. D. Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia // *Nat Rev Cardiol.* – 2016. – T. 13, № 2. – C. 106-20.
180. Rutkovskiy A., Sagave J., Czibik G., Baysa A., Zihlavnikova Enayati K., Hillestad V., Dahl C. P., Fiane A., Gullestad L., Gravning J., Ahmed S., Attramadal H., Valen G., Vaage J. Connective tissue growth factor and bone morphogenetic protein 2 are induced following myocardial ischemia in mice and humans // *Scand J Clin Lab Invest.* – 2017. – T. 77, № 5. – C. 321-331.
181. Soliman H., Rossi F. M. V. Cardiac fibroblast diversity in health and disease // *Matrix Biol.* – 2020. – T. 91-92. – C. 75-91.
182. Soltani L., Mahdavi A. H. Role of Signaling Pathways during Cardiomyocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells // *Cardiology.* – 2022. – T. 147, № 2. – C. 216-224.
183. Uscategui Calderon M., Gonzalez B. A., Yutzey K. E. Cardiomyocyte-fibroblast crosstalk in the postnatal heart // *Front Cell Dev Biol.* – 2023. – T. 11. – C. 1163331.
184. Borggreffe T., Lauth M., Zwijsen A., Huylebroeck D., Oswald F., Giaimo B. D. The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFbeta/BMP and hypoxia pathways // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – T. 1863, № 2. – C. 303-13.
185. Wang Y., Fang Y., Lu P., Wu B., Zhou B. NOTCH Signaling in Aortic Valve Development and Calcific Aortic Valve Disease // *Front Cardiovasc Med.* – 2021. – T. 8. – C. 682298.

186. Bollini S., Vieira J. M., Howard S., Dube K. N., Balmer G. M., Smart N., Riley P. R. Re-activated adult epicardial progenitor cells are a heterogeneous population molecularly distinct from their embryonic counterparts // *Stem Cells Dev.* – 2014. – T. 23, № 15. – C. 1719-30.
187. Vieira J. M., Howard S., Villa Del Campo C., Bollini S., Dube K. N., Masters M., Barnette D. N., Rohling M., Sun X., Hankins L. E., Gavriouchkina D., Williams R., Metzger D., Chambon P., Sauka-Spengler T., Davies B., Riley P. R. BRG1-SWI/SNF-dependent regulation of the Wt1 transcriptional landscape mediates epicardial activity during heart development and disease // *Nat Commun.* – 2017. – T. 8. – C. 16034.
188. Wagner K. D., Wagner N., Bondke A., Nafz B., Flemming B., Theres H., Scholz H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction // *FASEB J.* – 2002. – T. 16, № 9. – C. 1117-9.
189. Wagner K. D., Vukolic A., Baudouy D., Michiels J. F., Wagner N. Inducible Conditional Vascular-Specific Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta Leads to Rapid Cardiac Hypertrophy // *PPAR Res.* – 2016. – T. 2016. – C. 7631085.
190. Menasche P. Cell therapy trials for heart regeneration - lessons learned and future directions // *Nat Rev Cardiol.* – 2018. – T. 15, № 11. – C. 659-671.
191. Sharma S., Mishra R., Bigham G. E., Wehman B., Khan M. M., Xu H., Saha P., Goo Y. A., Datla S. R., Chen L., Tulapurkar M. E., Taylor B. S., Yang P., Karathanasis S., Goodlett D. R., Kaushal S. A Deep Proteome Analysis Identifies the Complete Secretome as the Functional Unit of Human Cardiac Progenitor Cells // *Circ Res.* – 2017. – T. 120, № 5. – C. 816-834.
192. Traister A., Patel R., Huang A., Patel S., Plakhotnik J., Lee J. E., Medina M. G., Welsh C., Ruparel P., Zhang L., Friedberg M., Maynes J., Coles J. Correction: Cardiac regenerative capacity is age- and disease-dependent in childhood heart disease // *PLoS One.* – 2021. – T. 16, № 1. – C. e0245808.
193. Zaidi S., Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease // *Circ Res.* – 2017. – T. 120, № 6. – C. 923-940.
194. Parameswaran S., Kumar S., Verma R. S., Sharma R. K. Cardiomyocyte culture - an update on the in vitro cardiovascular model and future challenges // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2013. – T. 91, № 12. – C. 985-98.
195. Papoutsis T., Luna-Zurita L., Prados B., Zaffran S., de la Pompa J. L. Bmp2 and Notch cooperate to pattern the embryonic endocardium // *Development.* – 2018. – T. 145, № 13.
196. Bray S. J. Notch signalling in context // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2016. – T. 17, № 11. – C. 722-735.
197. Gude N., Joyo E., Toko H., Quijada P., Villanueva M., Hariharan N., Sacchi V., Truffa S., Joyo A., Voelkers M., Alvarez R., Sussman M. A. Notch activation enhances lineage commitment and protective signaling in cardiac progenitor cells // *Basic Res Cardiol.* – 2015. – T. 110, № 3. – C. 29.
198. Mercer-Rosa L., Paridon S. M., Fogel M. A., Rychik J., Tanel R. E., Zhao H., Zhang X., Yang W., Shults J., Goldmuntz E. 22q11.2 deletion status and disease burden in children and adolescents with tetralogy of Fallot // *Circ Cardiovasc Genet.* – 2015. – T. 8, № 1. – C. 74-81.
199. Kovall R. A., Gebelein B., Sprinzak D., Kopan R. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force // *Dev Cell.* – 2017. – T. 41, № 3. – C. 228-241.
200. Bittel D. C., Butler M. G., Kibiryeva N., Marshall J. A., Chen J., Lofland G. K., O'Brien J. E., Jr. Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects // *BMC Med Genomics.* – 2011. – T. 4. – C. 1.
201. Conlon R. A., Reaume A. G., Rossant J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites // *Development.* – 1995. – T. 121, № 5. – C. 1533-45.
202. Koenig S. N., LaHaye S., Feller J. D., Rowland P., Hor K. N., Trask A. J., Janssen P. M., Radtke F., Lilly B., Garg V. Notch1 haploinsufficiency causes ascending aortic aneurysms in mice // *JCI Insight.* – 2017. – T. 2, № 21.

203. de la Pompa J. L., Epstein J. A. Coordinating tissue interactions: Notch signaling in cardiac development and disease // *Dev Cell*. – 2012. – T. 22, № 2. – C. 244-54.
204. Sano T., Ousaka D., Goto T., Ishigami S., Hirai K., Kasahara S., Ohtsuki S., Sano S., Oh H. Impact of Cardiac Progenitor Cells on Heart Failure and Survival in Single Ventricle Congenital Heart Disease // *Circ Res*. – 2018. – T. 122, № 7. – C. 994-1005.
205. Urbanek K., Cabral-da-Silva M. C., Ide-Iwata N., Maestroni S., Delucchi F., Zheng H., Ferreira-Martins J., Ogorek B., D'Amario D., Bauer M., Zerbini G., Rota M., Hosoda T., Liao R., Anversa P., Kajstura J., Leri A. Inhibition of notch1-dependent cardiomyogenesis leads to a dilated myopathy in the neonatal heart // *Circ Res*. – 2010. – T. 107, № 3. – C. 429-41.
206. Collesi C., Felician G., Secco I., Gutierrez M. I., Martelletti E., Ali H., Zentilin L., Myers M. P., Giacca M. Reversible Notch1 acetylation tunes proliferative signalling in cardiomyocytes // *Cardiovasc Res*. – 2018. – T. 114, № 1. – C. 103-122.
207. Geva T. Indications and timing of pulmonary valve replacement after tetralogy of Fallot repair // *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. – 2006.10.1053/j.pcsu.2006.02.009. – C. 11-22.
208. Dłuzniewska N., Podolec P., Skubera M., Smas-Suska M., Pajak J., Urbanczyk-Zawadzka M., Plazak W., Olszowska M., Tomkiewicz-Pajak L. Long-term follow-up in adults after tetralogy of Fallot repair // *Cardiovasc Ultrasound*. – 2018. – T. 16, № 1. – C. 28.
209. Kostina A., Bjork H., Ignatieva E., Irtyuga O., Uspensky V., Semenova D., Maleki S., Tomilin A., Moiseeva O., Franco-Cereceda A., Gordeev M., Faggian G., Kostareva A., Eriksson P., Malashicheva A. Notch, BMP and WNT/beta-catenin network is impaired in endothelial cells of the patients with thoracic aortic aneurysm // *Atheroscler Suppl*. – 2018. – T. 35. – C. e6-e13.
210. Kostina A., Shishkova A., Ignatieva E., Irtyuga O., Bogdanova M., Levchuk K., Golovkin A., Zhiduleva E., Uspenskiy V., Moiseeva O., Faggian G., Vaage J., Kostareva A., Rutkovskiy A., Malashicheva A. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves // *J Mol Cell Cardiol*. – 2018. – T. 114. – C. 211-219.
211. Ignatieva E., Kostina D., Irtyuga O., Uspensky V., Golovkin A., Gavriiliuk N., Moiseeva O., Kostareva A., Malashicheva A. Mechanisms of Smooth Muscle Cell Differentiation Are Distinctly Altered in Thoracic Aortic Aneurysms Associated with Bicuspid or Tricuspid Aortic Valves // *Front Physiol*. – 2017. – T. 8. – C. 536.
212. Kozyrev I., Dokshin P., Kostina A., Kiselev A., Ignatieva E., Golovkin A., Pervunina T., Grekhov E., Gordeev M., Kostareva A., Malashicheva A. Insights Image for "Dysregulation of Notch signaling in cardiac mesenchymal cells of patients with Tetralogy of Fallot" // *Pediatr Res*. – 2020. – T. 88, № 1. – C. 139.
213. MacGrogan D., Luna-Zurita L., de la Pompa J. L. Notch signaling in cardiac valve development and disease // *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. – 2011. – T. 91, № 6. – C. 449-59.
214. Luna-Zurita L., Prados B., Grego-Bessa J., Luxan G., del Monte G., Benguria A., Adams R. H., Perez-Pomares J. M., de la Pompa J. L. Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation // *J Clin Invest*. – 2010. – T. 120, № 10. – C. 3493-507.
215. Rutenberg J. B., Fischer A., Jia H., Gessler M., Zhong T. P., Mercola M. Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors // *Development*. – 2006. – T. 133, № 21. – C. 4381-90.
216. Zhou X. L., Fang Y. H., Wan L., Xu Q. R., Huang H., Zhu R. R., Wu Q. C., Liu J. C. Notch signaling inhibits cardiac fibroblast to myofibroblast transformation by antagonizing TGF-beta1/Smad3 signaling // *J Cell Physiol*. – 2019. – T. 234, № 6. – C. 8834-8845.
217. Shinde A. V., Humeres C., Frangogiannis N. G. The role of alpha-smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. – 2017. – T. 1863, № 1. – C. 298-309.

218. Nakajima Y., Mironov V., Yamagishi T., Nakamura H., Markwald R. R. Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: A role for transforming growth factor β 3 // *Developmental Dynamics*. – 1997. – T. 209, № 3. – C. 296-309.
219. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S. A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders // *Am J Pathol*. – 2011. – T. 179, № 3. – C. 1074-80.
220. Kovacic J. C., Dimmeler S., Harvey R. P., Finkel T., Aikawa E., Krenning G., Baker A. H. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review // *J Am Coll Cardiol*. – 2019. – T. 73, № 2. – C. 190-209.
221. Anbara T., Sharifi M., Aboutaleb N. Endothelial to Mesenchymal Transition in the Cardiogenesis and Cardiovascular Diseases // *Curr Cardiol Rev*. – 2020. – T. 16, № 4. – C. 306-314.
222. Zamurovic N., Cappellen D., Rohner D., Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity // *J Biol Chem*. – 2004. – T. 279, № 36. – C. 37704-15.
223. Sharff K. A., Song W. X., Luo X., Tang N., Luo J., Chen J., Bi Y., He B. C., Huang J., Li X., Jiang W., Zhu G. H., Su Y., He Y., Shen J., Wang Y., Chen L., Zuo G. W., Liu B., Pan X., Reid R. R., Luu H. H., Haydon R. C., He T. C. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells // *J Biol Chem*. – 2009. – T. 284, № 1. – C. 649-659.
224. Gorelova A., Berman M., Al Ghoulah I. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Arterial Hypertension // *Antioxid Redox Signal*. – 2021. – T. 34, № 12. – C. 891-914.
225. Ma L., Lu M. F., Schwartz R. J., Martin J. F. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning // *Development*. – 2005. – T. 132, № 24. – C. 5601-11.
226. Shimizu T., Tanaka T., Iso T., Matsui H., Ooyama Y., Kawai-Kowase K., Arai M., Kurabayashi M. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells // *J Biol Chem*. – 2011. – T. 286, № 21. – C. 19138-48.
227. Andres-Delgado L., Galardi-Castilla M., Munch J., Peralta M., Ernst A., Gonzalez-Rosa J. M., Tessadori F., Santamaria L., Bakkens J., Vermot J., de la Pompa J. L., Mercader N. Notch and Bmp signaling pathways act coordinately during the formation of the proepicardium // *Dev Dyn*. – 2020. – T. 249, № 12. – C. 1455-1469.
228. Lin C. H., Lilly B. Endothelial cells direct mesenchymal stem cells toward a smooth muscle cell fate // *Stem Cells Dev*. – 2014. – T. 23, № 21. – C. 2581-90.
229. Gurel Pekozer G., Torun Kose G., Hasirci V. Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells // *Microvasc Res*. – 2016. – T. 108. – C. 1-9.