

## ЗАВИСИМОСТЬ ОРГАНИЗАЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ ОТ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

© Н. Б. Бильдюг,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>1</sup> электронный адрес: relapse@yandex.ru*

В процессе культивирования кардиомиоцитов происходит реорганизация их сократительного аппарата с преобразованием типичных миофибрилл в структуры немышечного типа и последующим восстановлением исходной организации. Причины и механизмы описанных перестроек неизвестны. В ходе настоящей работы было показано, что при культивировании кардиомиоцитов на отдельных белках внеклеточного матрикса (ВКМ), а также на матриксе, нарабатанном сердечными фибробластами или такими же кардиомиоцитами, период нахождения сократительного аппарата в перестроенном состоянии сокращается, тогда как растворимые факторы кондиционированной культуральной среды не оказывают явного влияния на указанные перестройки. С помощью адаптированного для кардиомиоцитов метода выделения секретируемого ими ВКМ нами было подтверждено, что в процессе культивирования кардиомиоциты сами нарабатывают ВКМ, который по составу отличается от ВКМ сердечных фибробластов и меняется в зависимости от сроков культивирования.

**Ключевые слова:** кардиомиоциты, сократительный аппарат, внеклеточный матрикс.

**Принятые сокращения:** ВКМ — внеклеточный матрикс.

Кардиомиоциты представляют собой мышечные клетки сердца, которые обеспечивают его сократительную функцию. Кардиомиоциты имеют высокоорганизованный сократительный аппарат, представленный миофибриллами. Миофибриллы образованы актиновыми и миозиновыми филаментами, которые вместе со вспомогательными белками формируют структурно-функциональные единицы (саркомеры), регулярная организация которых обеспечивает поперечную исчерченность миофибрилл (Huxley, 1953; Squire, 1974; Wang, 1984).

Давно известно, что кардиомиоциты можно перевести в культуру и культивировать в течение длительного времени. Однако в процессе культивирования клетки теряют свою типичную организацию и способность к сокращению. При этом происходит перестройка их сократительного аппарата, которая заключается в исчезновении типичных миофибрилл и появлении структур, напоминающих по морфологии структуры сократительного аппарата немышечных клеток (стресс-фибриллы) (Nag, Cheng, 1981; Nag et al., 1983; Atherton et al., 1986; Борисов и др., 1989; Messerli et al., 1993; Nag et al., 1996). Причины и механизмы описанных перестроек неизвестны. Вероятно, они связаны с потерей клетками их естественного микроокружения при переводе в культуру. При этом было установлено, что кардиомиоциты в ходе длительного культивирования способны почти полностью восстанавливать исходную организацию сократительного аппарата и заново приобретать способность к сокращению (Nag et al., 1983, 1996; Борисов и др., 1989; Messerli et al., 1993). Такое восстановление свидетельствует о том, что клетки не окончательно утрачивают свои ис-

ходные свойства и, вероятно, в процессе культивирования способны в определенной степени воссоздавать то микроокружение, которое они теряют при выделении. В частности, реорганизация сократительного аппарата кардиомиоцитов может быть вызвана потерей внеклеточного матрикса (ВКМ), в окружении которого клетки находятся в ткани, и тогда его восстановление может объясняться постепенной наработкой собственных внеклеточных белков.

Цель настоящей работы — установить, могут ли кардиомиоциты в процессе культивирования синтезировать компоненты ВКМ и может ли этот матрикс оказывать влияние на восстановление исходной структуры их сократительного аппарата.

### Материал и методика

Получение первичной культуры кардиомиоцитов. Клетки миокарда выделяли из желудочков сердец новорожденных крыс (3—6-суточных). Использовали беспородных лабораторных крыс. Животных усыпляли эфиром, вскрывали грудную клетку, извлекали сердца, отсекали сосудистые пучки и сердца промывали изотоническим фосфатным буферным раствором (PBS: 140 mM NaCl, 50 mM KCl и 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4). Желудочки отделяли от предсердий, измельчали ножницами в небольшом объеме PBS на небольшие кусочки и инкубировали в течение 20 мин при 37 °C в растворе трипсина (1 мг/мл; Sigma, США) на PBS с добавлением гентамицина (50 мкг/мл; Биолот, Россия). Затем раствор трипсина с

небольшим содержанием клеток (в основном поврежденных) удаляли и к кусочкам ткани добавляли раствор протеолитических ферментов, содержащий коллагеназу I типа (коллагеназа краба; Биолот, Россия; 0.5 мг/мл), трипсин (1 мг/мл) и гентамицин (50 мкг/мл) на PBS. Ткань диссоциировали в растворе протеолитических ферментов 2 раза по 30 мин при 37 °C. Ферменты инактивировали путем добавления 10 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия).

Далее клетки отмывали от ферментов в полной питательной среде DMEM (модифицированная Дальбекко среда Игла; Биолот, Россия), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Для освобождения полученной суспензии клеток от большей части клеток эндотелия и клеток крови суспензию снова разводили в полной питательной среде и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в полной питательной среде и высевали в чашки Петри (Nunc, Дания).

Для получения культуры кардиомиоцитов, свободной от сердечных фибробластов, использовали метод селективной адгезии. Для этого суспензию клеток в полной питательной среде наносили на чашки Петри и помещали в инкубатор на 2 ч (этого времени достаточно для прикрепления большей части фибробластов). Затем осторожно отбирали среду, содержащую медленно прикрепляющиеся к подложке кардиомиоциты, и клетки переносили на чашки Петри (Nunc, Дания) с покровными стеклами в концентрации примерно 600 тыс. клеток на чашку. Таким образом, получали культуру, обогащенную кардиомиоцитами. Для остановки пролиферации оставшихся фибробластов на следующий день и далее при каждой второй смене среды в культуру добавляли ингибитор синтеза ДНК цитозинарабинозид (Sigma, США) в концентрации 3 мкг/мл. Клетки культивировали в при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Ростовую среду меняли на свежую через каждые 2—3 сут. Для наблюдения за состоянием культивируемых клеток использовали инвертированный микроскоп (ЛОМО, Россия).

Культивирование кардиомиоцитов в кондиционированной среде от фибробластов. Культуру, обогащенную сердечными фибробластами, получали в соответствии с методом селективной адгезии из смешанной культуры клеток сердца (см. выше). Немногочисленные непродлиферирующие кардиомиоциты, присутствующие в обогащенной фибробластами культуре, терялись в ходе дальнейшего культивирования и многократных пересевов клеток (примерно 5—6 пассажей). Таким образом получали чистую культуру сердечных фибробластов. Кондиционированную среду отбирали перед каждой процедурой посева фибробластов (каждые 2—3 сут). Свежевыделенные кардиомиоциты помещали непосредственно в кондиционированную среду от фибробластов (с добавлением цитозинарабинозида, как описано выше) и далее проводили смену среды на свежеполученную кондиционированную среду от культуры сердечных фибробластов каждые 2—3 сут.

Культивирование кардиомиоцитов на отдельных белках ВКМ. На силиконизированные покровные стекла наносили по 100 мкл раствора фибронектина (0.02 мг/мл; Sigma, США) или раствора ламинина 2/4 (любезно предоставленного И. В. Воронкиной, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) и инкубировали в холодильнике в течение ночи. Затем стекла промы-

вали 3 раза в PBS и наносили раствор 0.2%-ного бычьего сывороточного альбумина (на PBS) на 1 ч при 37 °C для предотвращения неспецифического связывания. Стекла промывали PBS и помещали в чашки Петри, на которые высевали культуру кардиомиоцитов в необходимой концентрации для дальнейшего длительного культивирования.

Получение проб ВКМ от кардиомиоцитов или сердечных фибробластов. Для выделения ВКМ с его минимальными повреждениями клетки (кардиомиоциты или фибробласты) на разных сроках культивирования на чашках Петри заливали PBS и инкубировали в при 4 °C в течение 2 ч. Затем добавляли теплый (37 °C) раствор Версена (Биолот, Россия) и инкубировали в термостате в течение 30 мин. Далее клетки снимали путем осторожного пипетирования. Когда под микроскопом по всей площади чашек не наблюдали оставшихся клеток или их фрагментов, PBS удаляли и чашки нагревали до 56 °C. Затем добавляли буфер (по 50 мкл на чашку) для проб (Laemmli, 1970) и белки соскребали с подложки при помощи скребка. Полученную суспензию переносили в пробирки и инкубировали при 90 °C в течение 5 мин. Пробы хранили при -70 °C.

Культивирование кардиомиоцитов на ВКМ, синтезированном фибробластами или кардиомиоцитами. Клетки на стеклах (фибробласты или кардиомиоциты) на разных сроках культивирования обрабатывали таким же образом, как для получения проб ВКМ. За процессом снятия клеток наблюдали с помощью микроскопа. Когда на стеклах не оставалось клеток или их остатков, стекла с оставшимся ВКМ несколько раз промывали PBS и помещали в новые чашки Петри, на которые наносили суспензию кардиомиоцитов для дальнейшего длительного культивирования.

Визуализация сократительного аппарата кардиомиоцитов методом непрямой иммунофлуоресценции. Клетки на покровных стеклах промывали PBS, фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида на PBS при комнатной температуре в течение 10 мин, затем промывали 3 раза PBS и обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 на PBS в течение 3 мин при комнатной температуре, затем промывали 5—6 раз PBS. Для выявления актиновых структур клетки обрабатывали родамин-фаллоидином (Sigma, США) в разведении 1 : 30 (на PBS) в течение 15 мин (в темноте, при комнатной температуре). Затем промывали 3 раза PBS. Для стабилизации флуоресцентной метки клетки заключали в специальную среду Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция) под покровным стеклом. Препараты хранили при 4 °C в защищенном от света месте.

Выявление коллагеновых структур. Клетки на покровных стеклах промывали PBS, фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида на PBS при комнатной температуре в течение 10 мин, затем промывали 3 раза PBS. Добавляли кроличьи антитела к коллагену I типа (Chemicon, США) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Затем стекла промывали 0.5%-ным раствором Tween (на PBS) и несколько раз PBS. Добавляли вторые антикроличьи антитела, конъюгированные с FITC (Sigma, США), и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре. Затем стекла промывали 0.5%-ным раствором Tween, несколько раз PBS и заключали в среду Mounting medium под покровным стеклом. Препараты хранили при 4 °C в защищенном от света месте. Готовые препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LEICA TCS SL (Leica, Герма-

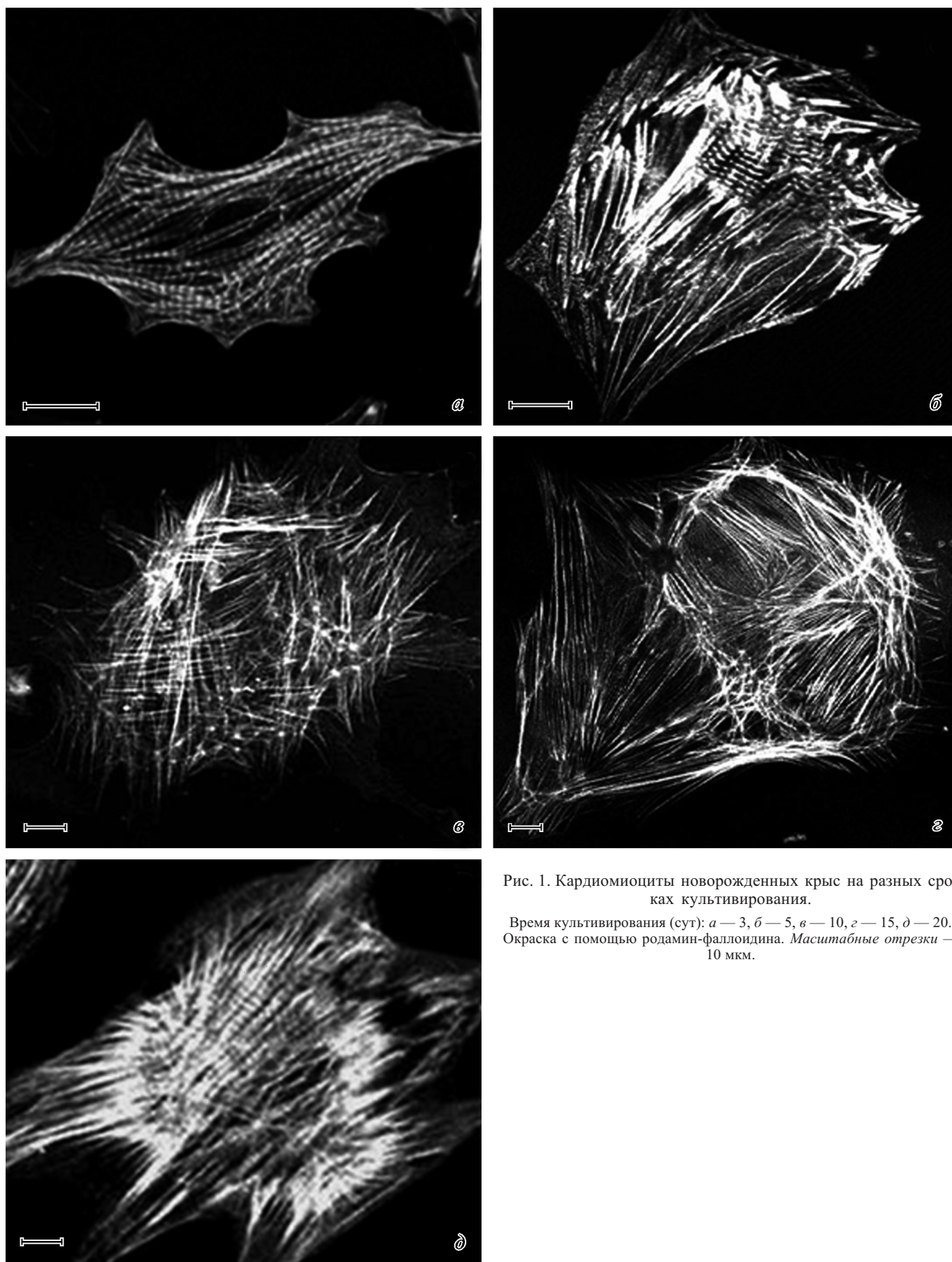


Рис. 1. Кардиомиоциты новорожденных крыс на разных сроках культивирования.

Время культивирования (сут): *а* — 3, *б* — 5, *в* — 10, *г* — 15, *д* — 20. Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.



ния) при 100-кратном увеличении объектива. Для возбуждения флуоресценции использовали HeNe-лазер с длиной волны 543 нм. Оптические срезы обрабатывали по программе Leica Confocal Software.

Электрофоретический анализ. Белки ВКМ разделяли методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии SDS (Laemmli, 1970). После электрофореза гели окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым или раствором серебра.

Для последующей масс-спектрометрии проводили гидролиз белка трипсином в полиакриламидном геле (Бобков и др., 2012). Масс-спектры получали на тандемном MALDI-времетраплетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс

в рефлекто-моду после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005 %. Идентификацию белка по «пептидному фингерпринту» осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

## Результаты и обсуждение

При культивировании кардиомиоцитов на стеклах в соответствии с ранее описанными методами (Nag et al., 1983; Ерохина и др., 2003) было показано, что на 3-и сут их сократительный аппарат имел типичную организацию, представленную миофибриллами с выраженной поперечной исчерченностью (рис. 1, а). Клетки на этом сроке имели полигональную форму с небольшим количеством псевдоподий, которые, вероятно, соответствовали участкам их прикрепления к подложке. Такие клетки начинали спонтанно сокращаться. На 5—6-е сут культивирования фрагменты миофибрилл сохранялись только в центральной части кардиомиоцитов, остальной объем клеток был заполнен актинсодержащими структурами, напоминающими стресс-фибриллы немuscle-клеток, причем исчерченные структуры непосредственно переходили в равномерно окрашиваемые фибриллы (рис. 1, б). Клетки на этом сроке начинали распластываться и увеличиваться в размере. На 8—12-е сут культивирования наблюдались максимальные изменения сократительного аппарата кардиомиоцитов. Исчерченные миофибриллы полностью исчезали, все тело клеток было заполнено структурами, подобными стресс-фибриллам (рис. 1, в). Клетки в это время утрачивали способность к сокращению.

Через 15—17 сут культивирования сократительный аппарат кардиомиоцитов все еще находился в перестроенном состоянии, но в центральной части клеток наблюдалось появление бусинообразных структур, которые обычно предшествуют формированию фрагментов миофибрилл (рис. 1, г). Почти полное восстановление исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов с восстановлением способности к сокращению наблюдали на 20—22-е сут культивирования. Миофибриллы заполняли почти весь объем клеток, однако общей упорядоченной организации миофибрилл не наблюдали. Миофибриллы наслаивались друг на друга под разными углами и имели разную ориентацию (рис. 1, д). Клетки в этот период отличались от исходных кардиомиоцитов.

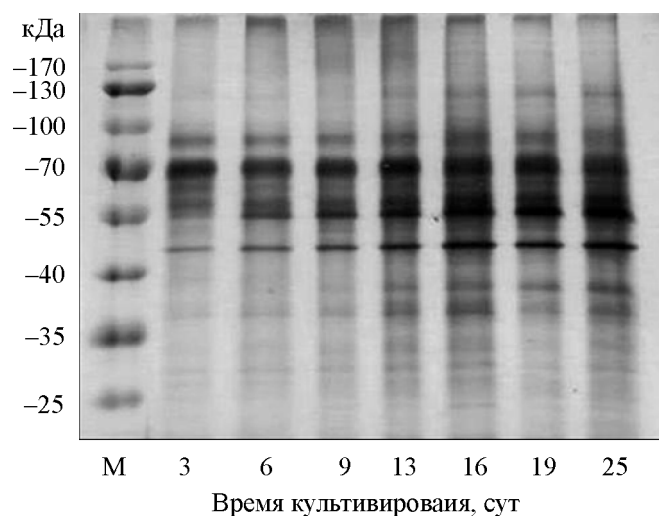


Рис. 2. Полиакриламидный гель (10%-ный), окрашенный раствором серебра после электрофоретического разделения белков внеклеточного матрикса, полученного от кардиомиоцитов на разных сроках их культивирования.

М — маркер. Цифры слева — молекулярные массы, кДа.

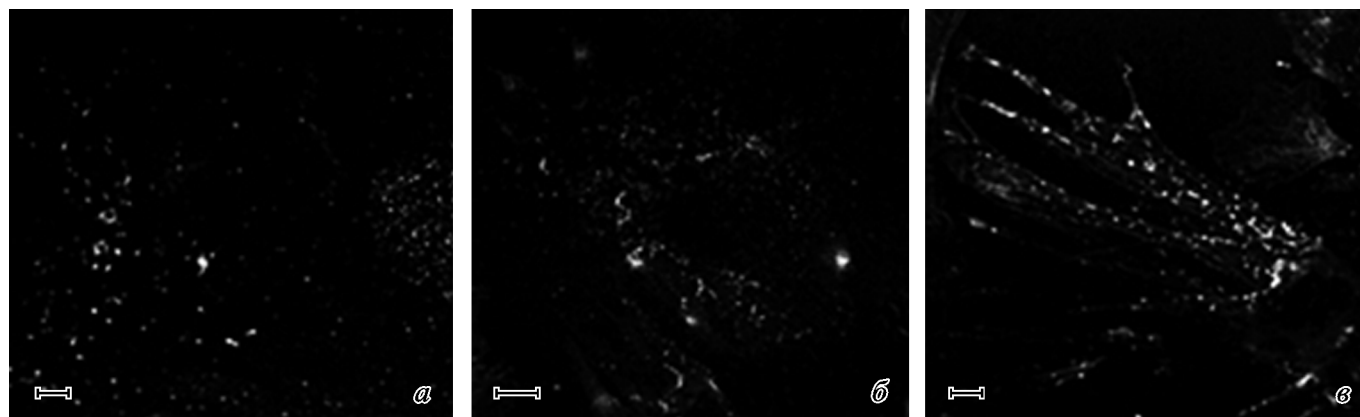


Рис. 3. Выявление внеклеточного коллагена I типа с помощью соответствующих антител на 5 (а), 8 (б) и 10-е (в) сут культивирования кардиомиоцитов.

Масштабные отрезки — 10 мкм.



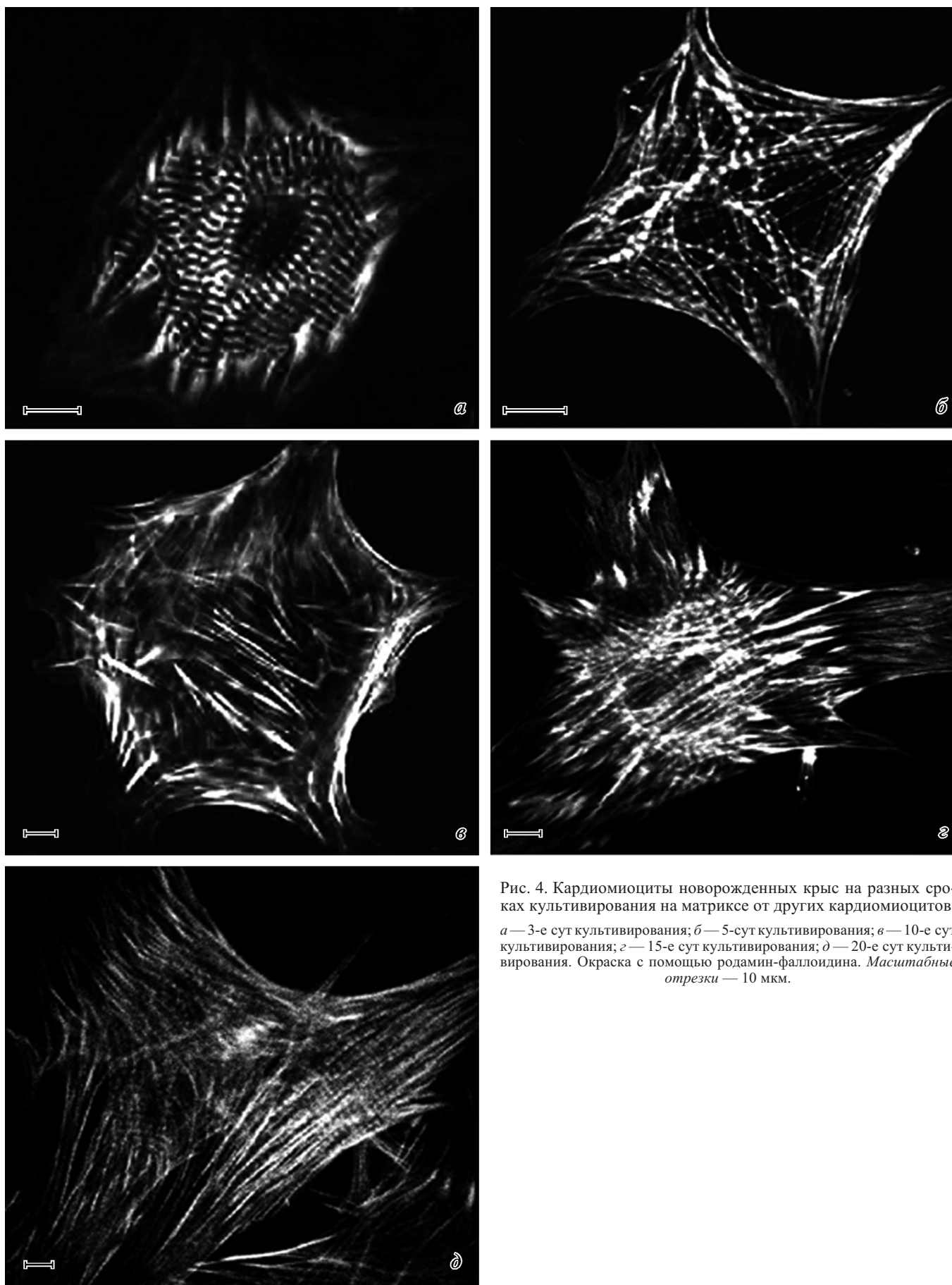


Рис. 4. Кардиомиоциты новорожденных крыс на разных сроках культивирования на матриксе от других кардиомиоцитов. *a* — 3-е сут культивирования; *б* — 5-сут культивирования; *в* — 10-е сут культивирования; *г* — 15-е сут культивирования; *д* — 20-е сут культивирования. Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.

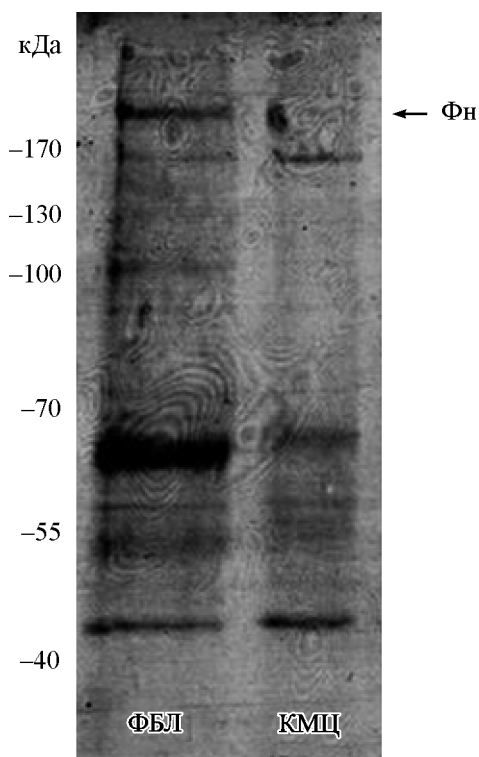


Рис. 5. Полиакриламидный гель (10%-ный), окрашенный Ку-масси бриллиантовым голубым после электрофоретического разделения белков внеклеточного матрикса, полученного от сердечных фибробластов (ФБЛ) и кардиомиоцитов (КМЦ).

Фн — фибронектин. Цифры слева — молекулярные массы, кДа.

Они были сильно увеличены в размере, распластаны и имели нетипичную для кардиомиоцитов форму с отсутствием продольной оси.

Таким образом, в процессе культивирования кардиомиоцитов на стеклах наблюдали обратимую реорганизацию их сократительного аппарата. Характер и сроки описанных перестроек соответствуют данным, приведенным в литературе (Nag et al., 1983, 1996; Борисов и др., 1989; Bugaisky, Zak, 1989; Messerli et al., 1993). Измененная морфология клеток после восстановления организации их сократительного аппарата по сравнению с исходными кардиомиоцитами, вероятно, связана с необходимостью распластывания в новых для них двухмерных условиях культивирования на подложке.

Для того чтобы оценить способность кардиомиоцитов синтезировать компоненты ВКМ в культуре, с помощью вышеописанного адаптированного для кардиомиоцитов метода получали пробы ВКМ. В ходе электрофоретического анализа было показано, что белковый состав ВКМ кардиомиоцитов на разных сроках культивирования фактически не различается. На 13-е сут культивирования количество белков возрастает, а также незначительно меняется их соотношение. Максимальное количество белков наблюдали на 16-е сут культивирования кардиомиоцитов (рис. 2).

На 5, 8 и 10-е сут культивирования выявляли внеклеточный коллаген с помощью соответствующих антител. На 5-е сут культивирования кардиомиоцитов наблюдали диффузные включения коллагена во внеклеточном пространстве (рис. 3, а). На 8-е сут выявляли короткие фрагменты коллагеновых фибрилл (рис. 3, б). На 10-е сут

наблюдали выраженные коллагеновые структуры (рис. 3, в).

Данные электрофоретического анализа, а также результаты меченая коллагена свидетельствуют о том, что кардиомиоциты в процессе культивирования постепенно нарабатывают собственные белки ВКМ. Таким образом, перестроенное состояние сократительного аппарата и изменение морфологии кардиомиоцитов может объясняться, с одной стороны, неспособностью поддержания типичной морфологии в отсутствие необходимого ВКМ, с другой — необходимостью синтеза компонентов ВКМ. Нарастание количества белков наблюдается на таких сроках культивирования, которые предшествуют восстановлению сократительного аппарата кардиомиоцитов после процесса его реорганизации, а максимальное количество нарабатанных белков ВКМ соответствует началу восстановления исходной организации и возобновлению сокращений в культуре. Вероятно, нарабатанный кардиомиоцитами к этому сроку матрикс является достаточным для возможности поддержания типичной организации их сократительного аппарата и выполнения основной функции.

Для того чтобы проверить, является ли ВКМ, нарабатанный самими кардиомиоцитами, достаточным для поддержания типичной организации их сократительного аппарата, свежeweделенные клетки наносили на ВКМ, полученный от таких же кардиомиоцитов после длительного культивирования (рис. 4). В этих условиях на 5—6-е сут культивирования все еще сохранялась миофибриллярная организация, неисчерченные структуры выявлялись только на периферии клеток (рис. 4, б). На 8—10-е сут сократительный аппарат полностью перестраивался (рис. 4, в), но уже на 15—17-е сут происходило почти полное восстановление исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов (рис. 4, г). Таким образом, при культивировании кардиомиоцитов на матриксе, синтезированном такими же кардиомиоцитами, сокращался период нахождения сократительного аппарата в перестроенном состоянии. При этом, однако, непрерывного поддержания его исходной организации не было.

Поскольку в сердечной ткани кардиомиоциты находятся в окружении фибробластов, которые являются основными продуцентами белков ВКМ, было сделано предположение о том, что матрикс, полученный от кардиомиоцитов, может не соответствовать по своему составу матриксу, присутствующему в ткани сердца. Для сравнения матрикса, синтезированного кардиомиоцитами, и матрикса, синтезированного фибробластами, проводили электрофоретический анализ внеклеточных белков, полученных после снятия с подложки кардиомиоцитов и фибробластов. Действительно, существуют различия в белковом составе и соотношении некоторых белков. В частности, в матриксе от фибробластов относительное количество белка с мол. массой более 170 кДа (рис. 5, Фн) значительно выше, чем в матриксе от кардиомиоцитов. С помощью масс-спектрометрического метода было определено, что этот белок представляет собой фибронектин (спектры не демонстрируются). На основании этих данных было сделано предположение о том, что матрикс, полученный от сердечных фибробластов, может являться оптимальным для поддержания типичной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов. Для проверки этого предположения кардиомиоциты культивировали на матриксе, нарабатанном сердечными фибробластами (рис. 6). В этих условиях культивирования происходило такое же сокращение периода нахождения

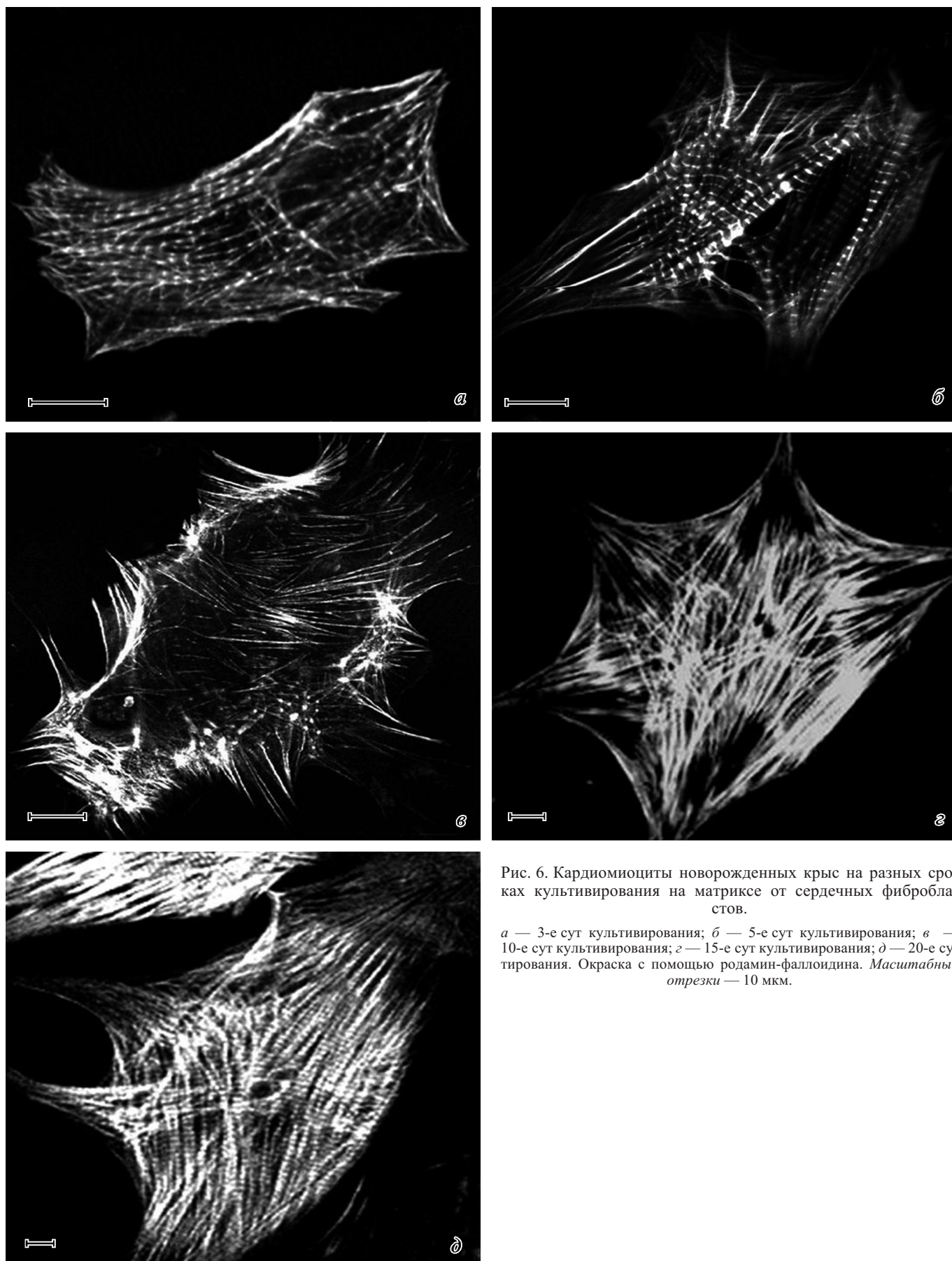


Рис. 6. Кардиомиоциты новорожденных крыс на разных сроках культивирования на матриксе от сердечных фибробластов.

*a* — 3-е сут культивирования; *б* — 5-е сут культивирования; *в* — 10-е сут культивирования; *г* — 15-е сут культивирования; *д* — 20-е сут культивирования. Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.



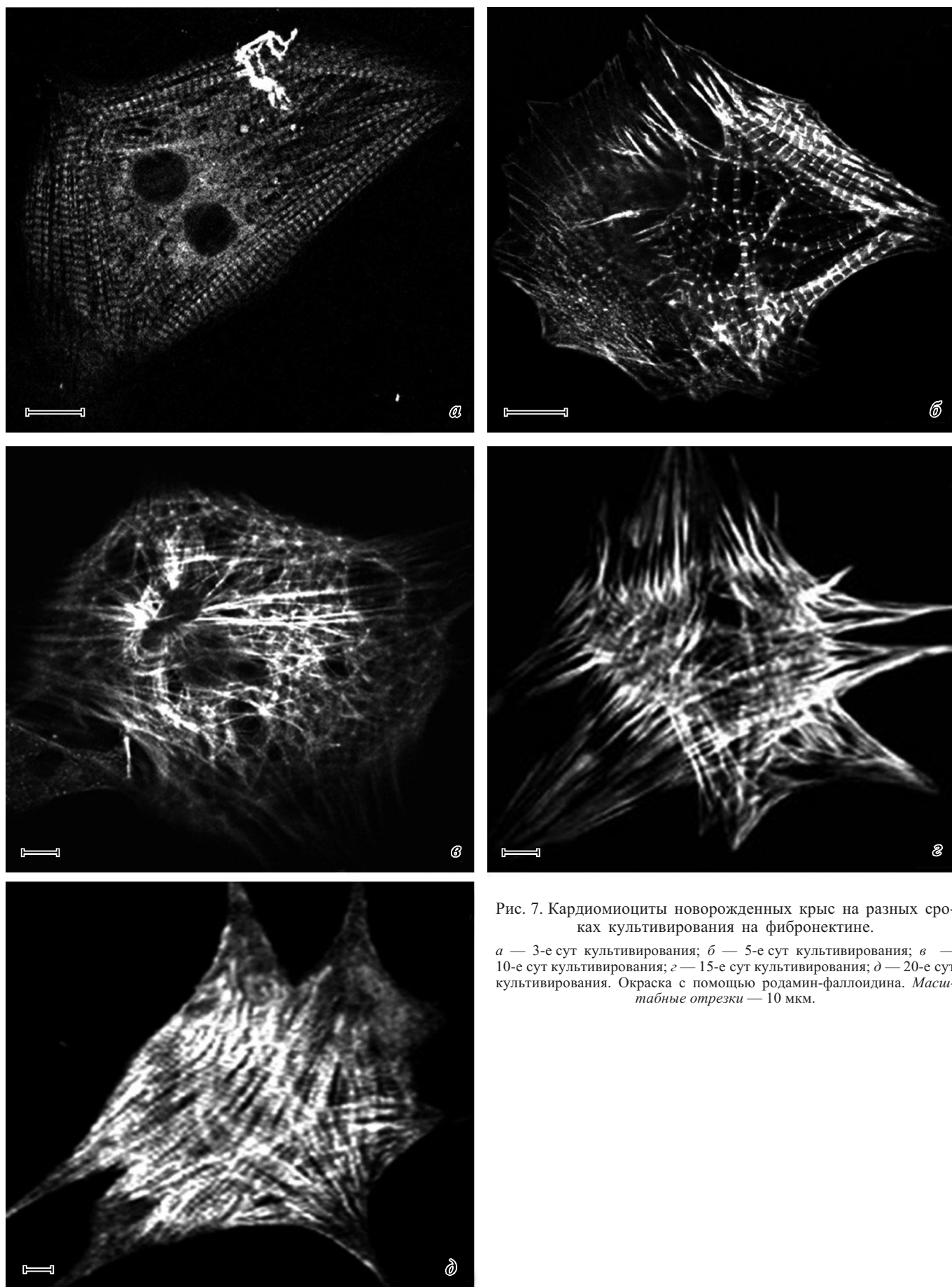


Рис. 7. Кардиомиоциты новорожденных крыс на разных сроках культивирования на фибронектине.

*a* — 3-е сут культивирования; *б* — 5-е сут культивирования; *в* — 10-е сут культивирования; *г* — 15-е сут культивирования; *д* — 20-е сут культивирования. Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.

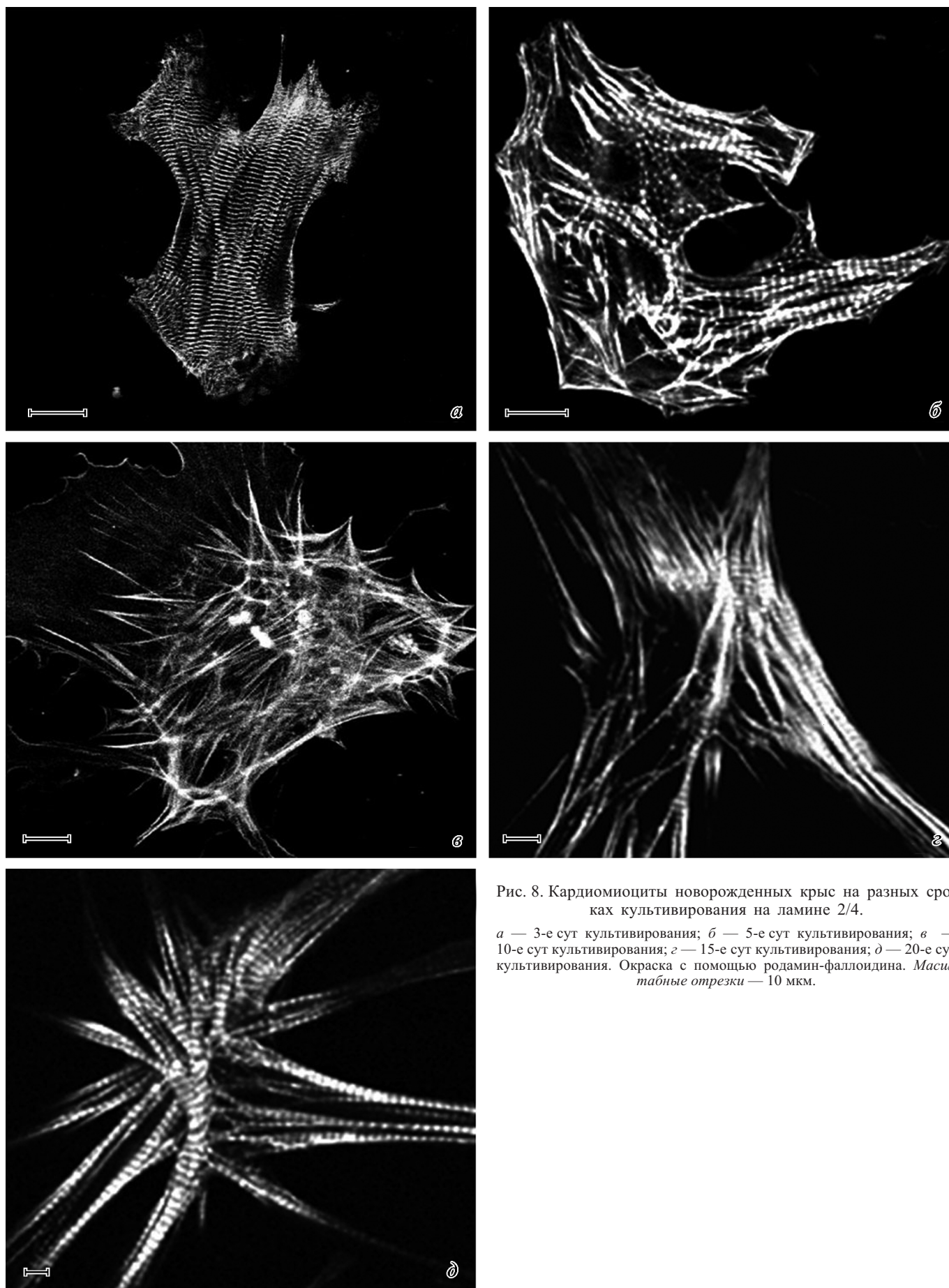


Рис. 8. Кардиомиоциты новорожденных крыс на разных сроках культивирования на ламине 2/4.

*a* — 3-е сут культивирования; *б* — 5-е сут культивирования; *в* — 10-е сут культивирования; *г* — 15-е сут культивирования; *д* — 20-е сут культивирования. Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.



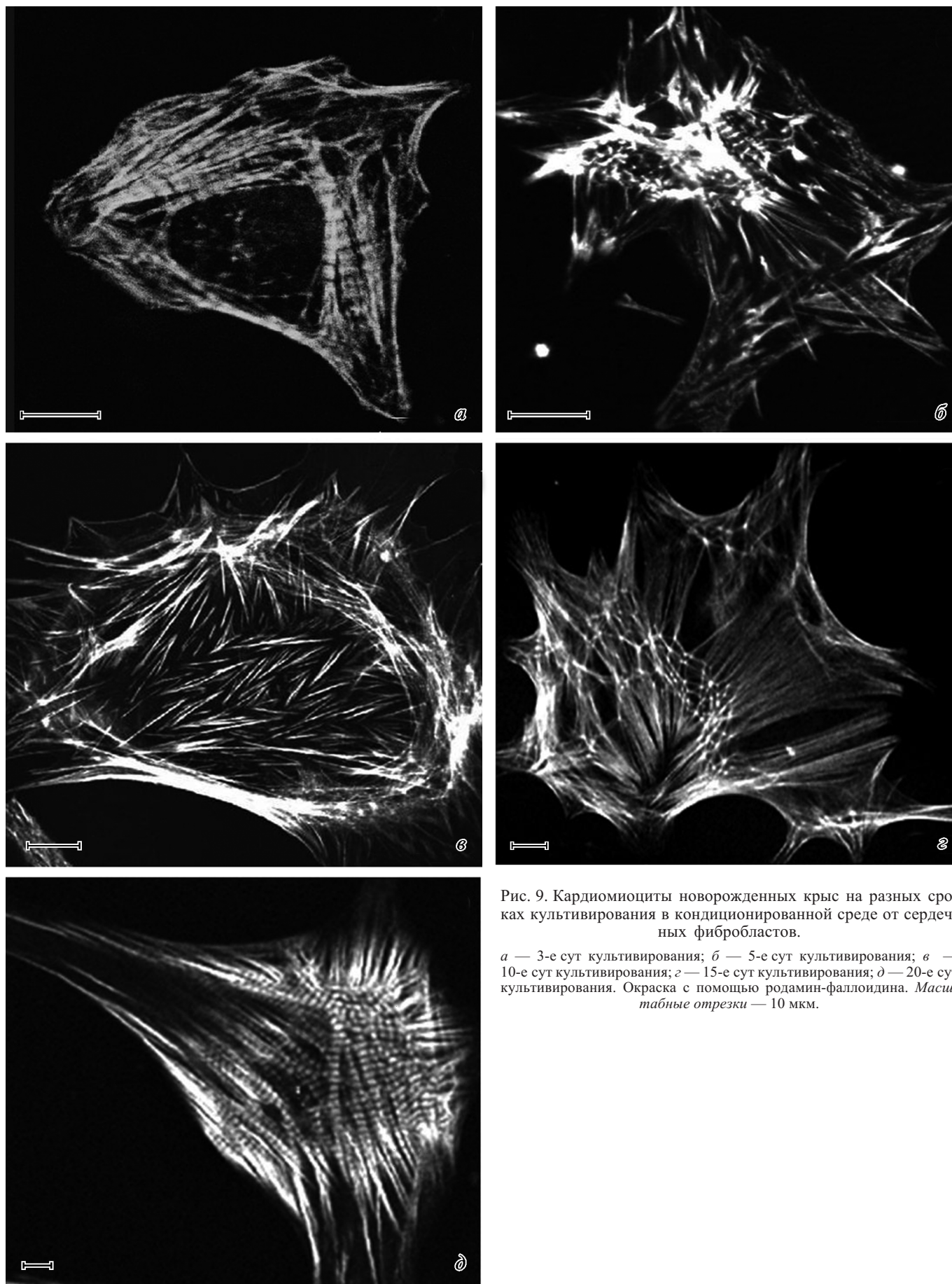


Рис. 9. Кардиомиоциты новорожденных крыс на разных сроках культивирования в кондиционированной среде от сердечных фибробластов.

*a* — 3-е сут культивирования; *б* — 5-е сут культивирования; *в* — 10-е сут культивирования; *г* — 15-е сут культивирования; *д* — 20-е сут культивирования. Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.



сократительного аппарата в перестроенном состоянии, как и в случае культивирования клеток на матриксе от кардиомиоцитов.

Поскольку ВКМ состоит не только из белков, но также из других компонентов, решили проверить, могут ли отдельные белки ВКМ оказывать влияние на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов. Для этого клетки культивировали на двух отдельных белках — ламинине и фибронектине, которые являются мажорными белками ВКМ и, как известно, влияют на пространственную организацию сократительных структур в немышечных клетках (Арэ и др., 1999; Петухова и др., 2004). При культивировании клеток как на ламинине, так и на фибронектине происходило такое же сокращение периода нахождения сократительного аппарата в перестроенном состоянии, как и в случае культивирования клеток на ВКМ (рис. 7, 8).

Таким образом, белки ВКМ действительно оказывают влияние на перестройки сократительного аппарата культивируемых кардиомиоцитов, но не обеспечивают полного поддержания его исходной организации.

Так как кардиомиоциты в ткани взаимодействуют не только с матриксом, но и с растворимыми факторами микроокружения, в частности продуцируемыми фибробластами, было решено сопоставить их действие с влиянием ВКМ на сократительный аппарат кардиомиоцитов. Для этого кардиомиоциты культивировали в кондиционированной среде от сердечных фибробластов. При этом не наблюдали каких-либо изменений в поведении сократительного аппарата кардиомиоцитов по сравнению с контрольными клетками (рис. 9). Таким образом, растворимые факторы сами по себе не оказывают очевидного влияния на динамику сократительного аппарата кардиомиоцитов.

Несмотря на то что была показана способность кардиомиоцитов синтезировать компоненты ВКМ в процессе культивирования и подтвердилось предположение о влиянии белков ВКМ на перестройки их сократительного аппарата, все же этого влияния оказалось недостаточно для полного и непрерывного поддержания их типичной организации. По-видимому, существуют другие факторы, необходимые для сохранения исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре. Одним из таких факторов может являться культивирование в трехмерных условиях, в которых клетки находятся в составе ткани. Проверка этого предположения будет проводиться в дальнейшей работе.

## Список литературы

- Арэ А. Ф., Поспелова Т. В., Пинаев Г. П. 1999. Особенности структурной организации актинового цитоскелета нормальных, иммортализованных и трансформированных фибробластов крысы и ее изменения под влиянием белков внеклеточного матрикса. Цитология. 41 (8) : 707—715.
- Бобков Д. Е., Айзеништадт А. А., Кропачёва И. В., Пинаев Г. П. 2012. Выделение и анализ белковых комплексов, содержащих тропомиозин. Цитология. 54 (1) : 33—37.
- Борисов А. Б., Гончарова Е. И., Пинаев Г. П., Румянцев П. П. 1989. Изменения локализации  $\alpha$ -актинина и миофибриллогенеза в кардиомиоцитах во время культивирования. Цитология. 31 (6) : 642—646.
- Ерохина И. Л., Семенова Е. Г., Емельянова О. И., Крылова М. И. 2003. Клетки желудочков сердца неонатальных крыс в культуре: синтез ДНК, ультраструктура и локализация предсердного натрийуретического пептида. Цитология. 45 (7) : 621—627.
- Петухова О. А., Туроверова Л. В., Кропачёва И. В., Пинаев Г. П. 2004. Анализ морфологических особенностей популяции клеток эпидермоидной карциномы A431, распластанных на иммобилизованных лигандах. Цитология. 46 (1) : 5—15.
- Atherton B. T., Meyer D. M., Simpson D. G. 1986. Assembly and remodeling of myofibrils and intercalated discs in cultured neonatal rat heart cells. J. Cell Sci. 86 : 233—248.
- Huxley H. E. 1953. Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. Biochim. biophys. acta. 12 (3) : 387—394.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Messerli J., Eppenberger-Eberhardt M., Rutishauser B., Schwarb P., von Arx P., Koch-Schneidemann S., Eppenberger H., Perriard J. 1993. Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy. Histochemistry. 100 (3) : 193—202.
- Nag A. C., Cheng M. 1981. Adult mammalian cardiac muscle cells in culture. Tissue Cell. 13 (3) : 515—523.
- Nag A., Cheng M., Fischman D., Zak R. 1983. Long-term cell culture of adult mammalian cardiac myocytes: electron microscopic and immunofluorescent analyses of myofibrillar structure. J. Mol. Cell. Cardiol. 15 (5) : 301—317.
- Nag A. C., Lee M. L., Sarkar F. H. 1996. Remodelling of adult cardiac muscle cells in culture: dynamic process of disorganization and reorganization of myofibrils. J. Muscle Res. Cell Motility. 17 (3) : 313—334.
- Squire J. M. 1974. Symmetry and three-dimensional arrangement of filaments in vertebrate striated muscle. J. Mol. Biol. 90 (1) : 153—160.
- Wang K. 1984. Cytoskeletal matrix in striated muscle: the role of titin, nebulin and intermediate filaments. Adv. Exp. Med. Biol. 170 : 285—305.

Поступила 3 VI 2013

## EXTRACELLULAR MATRIX DEPENDENCE OF THE CARDIOMYOCYTE CONTRACTILE APPARATUS ORGANIZATION

N. B. Bildjug,<sup>1</sup> G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;<sup>1</sup> e-mail: relapse@yandex.ru

In the process of cardiomyocyte culturing, their contractile apparatus undergoes reorganization involving the conversion of typical myofibrils into non-muscle type structures and subsequent restoration of the initial organization. The causes and mechanisms of the rearrangements described are unknown. In this study, we have shown that cultivation of cardiomyocytes on the individual extracellular matrix proteins, as well as on the mat-

rix produced either by cardiac fibroblasts or by similar cardiomyocyte, reduces the time when the contractile apparatus is in a rearranged state, whereas soluble factors of the conditioned culture do not affect obviously these rearrangements. Using method of extracellular matrix isolation adapted for cardiomyocytes, we have shown that cardiomyocytes in culture produce their own extracellular matrix, which differs from the extracellular matrix of cardiac fibroblasts and varies with the culturing time.

Key words: cardiomyocytes, contractile apparatus, extracellular matrix.

---