

ОРГАНИЗАЦИЯ СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В КОЛЛАГЕНОВЫХ ГЕЛЯХ

© Н. Б. Бильдюг,¹ Н. М. Юдинцева, Г. П. Пинаев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: relapse@yandex.ru

Известно, что в процессе культивирования кардиомиоцитов в двухмерных системах культивирования изменяется их морфология и реорганизуется сократительный аппарат. В связи с этим монослойные культуры кардиомиоцитов являются плохой моделью для исследования биологически важных процессов в сердце. Настоящая работа направлена на поиск наиболее оптимальных условий культивирования кардиомиоцитов для возможности поддержания их типичной морфологии и естественного состояния сократительного аппарата. В работе проведено исследование организации сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в трехмерных коллагеновых гелях разной плотности. Показано, что при длительном культивировании кардиомиоцитов в коллагеновых гелях с концентрацией 1 мг/мл сохраняется исходная организация их сократительного аппарата, тогда как в коллагеновых гелях с концентрациями 0.5 и 1.5 мг/мл наблюдается частичная перестройка их сократительного аппарата. Таким образом, кардиомиоциты, помещенные в трехмерные коллагеновые гели с концентрацией белка 1 мг/мл, можно рассматривать как приближенную к естественным условиям модель культивирования.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс (ВКМ), кардиомиоциты (КМЦ), коллагеновый гель, сократительный аппарат.

Кардиомиоциты (КМЦ) представляют собой клетки сердца, которые обеспечивают его основную функцию — сокращение. В связи с этим КМЦ имеют высокоорганизованный сократительный аппарат, представленный миофибриллами. В состав миофибрилл входят актиновые и миозиновые филаменты, которые вместе со вспомогательными белками формируют структурно-функциональные единицы, саркомеры, регулярная организация которых обеспечивает поперечную исчерченность миофибрилл (Huxley, 1953; Squire, 1974; Wang, 1984).

Известно, что КМЦ можно выделять из ткани сердца и поддерживать в культуре в течение длительного времени. Однако в процессе культивирования КМЦ утрачивают исходную организацию. При этом перестраивается их сократительный аппарат с обратимым преобразованием типичных миофибрилл в неисчерченные структуры, напоминающие стресс-фибриллы немышечных клеток (Nag, Cheng, 1981; Nag et al., 1983, 1996; Atherton et al., 1986; Борисов и др., 1989; Messerli et al., 1993). Поскольку в организме не происходит подобных перестроек сократительного аппарата КМЦ, первичная культура КМЦ имеет целый ряд ограничений для ее использования в качестве модельной системы для изучения биологически важных процессов в сердце. До настоящего времени причины описанных перестроек в условиях *in vitro* неизвестны. В связи с этим исследования на первичной культуре КМЦ, как правило, проводят до начала реорганизации их сократительного аппарата, т. е. в течение первых нескольких суток после их получения.

Ранее нами подробно описаны обратимые перестройки сократительного аппарата КМЦ в процессе их культивирования (Бильдюг, Пинаев, 2013б). Реорганизация сократительного аппарата клеток начинается на 5—6-е сут с полным исчезновением исчерченных структур на 8—10-е сут культивирования. Восстановление исходной организации сократительного аппарата начинается на 15—17-е сут с полным восстановлением к 20—22-м сут культивирования. Можно предполагать, что такие перестройки связаны с потерей клетками их естественного микроокружения при переводе в культуру, а постепенное восстановление исходной организации, возможно, связано со способностью клеток в некоторой степени его воссоздавать.

Подавляющее большинство клеток в организме находится в непосредственном контакте с внеклеточным матриксом (ВКМ). ВКМ образует упорядоченную пространственную сеть, на поверхности и внутри которой клетки могут перемещаться и взаимодействовать друг с другом. ВКМ продуцируется специализированными клетками и в различных тканях имеет разный состав и пространственную организацию. В мышечной ткани сердца основные компоненты ВКМ синтезируются фибробластами, эндотелиоцитами и перицитами, в то время как кардиомиоциты специализируются на функции сокращения.

Согласно нашим ранее полученным данным, при культивировании КМЦ на отдельных белках ВКМ, а также на матриксе, предварительно наработанном самими КМЦ, происходит сокращение периода нахождения их сократительного аппарата в перестроенном состоянии

(Бильдюг, Пинаев, 2013а). Однако непрерывного поддержания типичной организации сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования не происходит. Мы предположили, что для ее сохранения в культуре помимо состава ВКМ может быть существенна его трехмерная организация.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о значительных морфологических различиях между эмбриональными КМЦ, помещенными на двухмерные подложки и находящимися в трехмерных агрегатах (Soares et al., 2012). Есть ряд работ по культивированию КМЦ в трехмерных системах. Например, согласно данным одной из работ, клетки сердца новорожденных крыс и куриц помещали в трехмерную систему, содержащую матригель и коллаген, и через 5—7 сут наблюдали спонтанные сокращения, которые при механическом растяжении гелей продолжались еще в течение нескольких суток (Zimmermann et al., 2004). В другой работе эмбриональные куриные КМЦ помещали в коллагеновые гели при их механическом натяжении и наблюдали образование тканеподобных структур и спонтанные сокращения (Eschenhagen et al., 1997).

Однако пока отсутствуют данные о динамике сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их длительного культивирования в трехмерных системах. Кроме того, фактически во всех опубликованных работах по культивированию КМЦ в трехмерных системах используется смешанная культура клеток сердца, в которой помимо КМЦ присутствуют сердечные фибробласты, способные оказывать как непосредственное, так и косвенное влияние на поведение КМЦ.

Известно, что основными структурными компонентами ВКМ в сердце являются коллагены. Коллаген I типа составляет примерно 85, а коллаген III типа — примерно 11 % от общего коллагена в сердце (DeSouza, 2002; Jugdutt, 2003). Поскольку коллаген I типа является доминирующим белком ВКМ в ткани сердца, мы решили исследовать поведение сократительного аппарата кардиомиоцитов при их длительном культивировании в трехмерных коллагеновых гелях.

За последние годы появилось много данных о том, что поведение и фенотип различных клеток в культуре могут зависеть от плотности внеклеточного матрикса (Yeung et al., 2005; Gu et al., 2012; Wang et al., 2012; Hopp et al., 2013; Li et al., 2014; Lu et al., 2014). Кроме того, имеются данные, указывающие на то, что плотность ВКМ влияет на морфологию и функциональную активность КМЦ (Engler et al., 2008; Bhana et al., 2010; Forte et al., 2012). В связи с этим мы предположили, что организация сократительного аппарата КМЦ может различаться в гелях с разной концентрацией коллагена.

Таким образом, задача нашей работы заключалась в подборе условий трехмерного культивирования чистой культуры КМЦ, наиболее приближенных к условиям *in vivo* и позволяющим сохранять типичную морфологию КМЦ и естественную организацию их сократительного аппарата в процессе длительного культивирования. Для этого дополнительно исследовали организацию сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в коллагеновых гелях различной концентрации.

Материал и методика

Реактивы: питательная среда DMEM (модифицированная Дальбекко среда Игла; Биолот, Россия); питательная среда 199 (Sigma-Aldrich, США); сыворотка эмбрионов коров (Gibco, США); коллаген и гентамицин (Биолот, Россия); коллагеназа I типа (коллагеназа краба; Биолот, РФ), трипсин, изотонический фосфатный буфер (PBS, pH 7.4: 140 mM NaCl, 50 mM KCl и 10 mM Na₂HPO₄), цитозин-арабинозид; родамин-фаллоидин (Sigma-Aldrich, США); заключающая среда Mounting medium (Pharmacia Biotech., Швеция).

Получение первичной культуры кардиомиоцитов. Работу проводили на беспородных лабораторных крысах. Клетки миокарда выделяли из желудочков сердец новорожденных животных (3—6-суточных). Животных усыпляли эфиром, вскрывали грудную клетку, извлекали сердца, отсекали сосудистые пучки и сердца промывали PBS. Желудочки отделяли от предсердий, измельчали ножницами в небольшом объеме PBS и инкубировали в растворе трипсина с концентрацией 1 мг/мл в течение 20 мин при 37 °С. Затем раствор трипсина с небольшим содержанием клеток (в основном поврежденных) удаляли и к оставшимся кусочкам ткани добавляли раствор протеолитических ферментов, содержащий коллагеназу I типа (0.5 мг/мл) и трипсин (1 мг/мл). Ткань диссоциировали в растворе протеолитических ферментов 2 раза по 30 мин при 37 °С. Действие ферментов инактивировали путем добавления 10 % сыворотки эмбрионов коров. Клетки в суспензии отмывали от ферментов, добавляя полную питательную среду DMEM, содержащую 10 % сыворотки эмбрионов коров и гентамицин (50 мкг/мл), и далее центрифугируя при 200 g в течение 5 мин. Для освобождения полученной суспензии от большей части клеток эндотелия и клеток крови суспензию снова разводили в полной питательной среде и центрифугировали при 150 g 5 мин.

Для того чтобы отделить более адгезивные фибробласты от медленно прикрепляющихся КМЦ, суспензию клеток наносили на чашки Петри и оставляли в инкубаторе на 2 ч (время, достаточное для адгезии большинства фибробластов). Затем неприкрепившиеся КМЦ переносили на другие чашки Петри в концентрации примерно $6 \cdot 10^4$ кл/см². Таким образом получали культуру, обогащенную кардиомиоцитами. Для того чтобы избавиться от оставшихся фибробластов, на 2-е сут культивирования и далее при каждой второй смене среды в культуру добавляли ингибитор синтеза ДНК цитозин-арабинозид в концентрации 3 мкг/мл. Клетки культивировали в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO₂ при 37 °С. Смену среды производили каждые 2—3 сут. За состоянием культивируемых клеток наблюдали с помощью инвертированного микроскопа (ЛЮМО, Россия). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окраски раствором трипанового синего.

Культивирование кардиомиоцитов в коллагеновых гелях. Для приготовления коллагеновых гелей с разной концентрацией белка (0.5, 1 и 1.5 мг/мл) использовали коллаген I типа, полученный по стандартной методике (Chandrakasan et al., 1967), стерильный 0.34 M раствор NaOH (для подведения pH 7.0) и концентрированную (10×) питательную среду 199. В полученную смесь добавляли суспензию КМЦ в питательной среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров и гентамицин. Незаполимеризованные гели с клетками

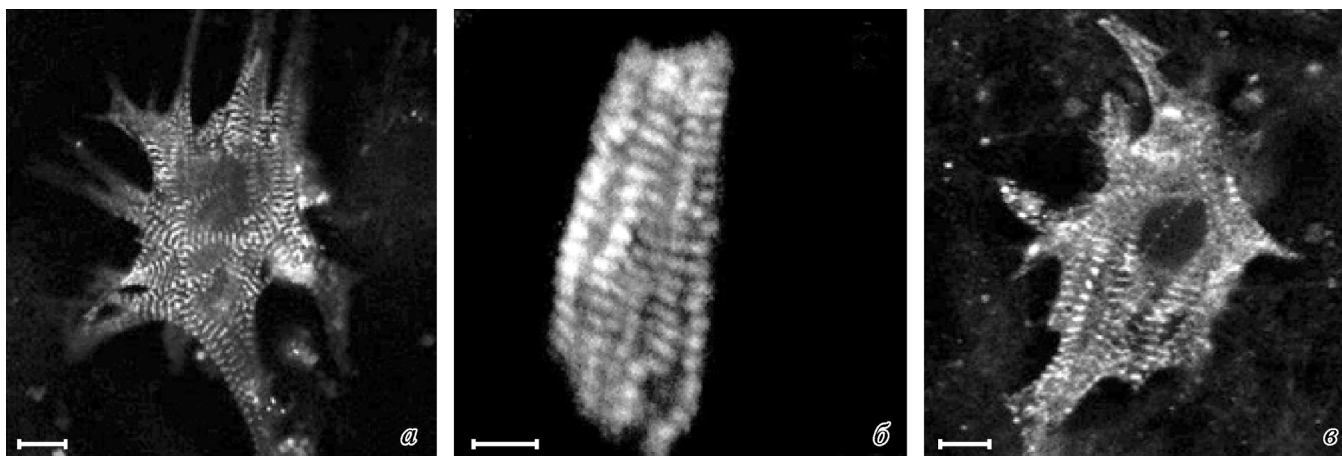


Рис. 1. Кардиомиоциты новорожденных крыс на 10-е сут культивирования в коллагеновых гелях с разной концентрацией белка: 0.5 (а), 1 (б) и 1.5 (в) мг/мл.

Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.

наносили на покровные стекла по 100 мкл на 1 стекло и в чашке Петри помещали в инкубатор. Конечная концентрация клеток на 1 стекло в гелях разной концентрации была одинаковой и составляла $3 \cdot 10^5$. После полимеризации гелей в чашки добавляли среду DMEM с сывороткой и гентамицином и клетки культивировали в течение 3 нед. Смену среды проводили каждые 2—3 сут.

Оценка организации сократительного аппарата КМЦ с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции. Приготовление препаратов проводили при комнатной температуре. Гели с клетками промывали изотоническим PBS. Фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в течение 20 мин, затем многократно промывали PBS. Обработывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин, затем многократно промывали раствором PBS. Для выявления актиновых структур клетки обрабатывали раствором родамин-фаллоидина в разведении 1 : 30 в течение 30 мин (в темноте). Затем многократно промывали раствором PBS. Для стабилизации флуоресцентной метки клетки заключали в среду Mounting medium под покровным стеклом. Препараты хранили при 4 °С в защищенном от света месте.

Конфокальная микроскопия. Препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LEICA TCS SL (Leica, Германия) при 100-кратном увеличении объектива. Для возбуждения флуоресценции использовали HeNe-лазер с длиной волны 543 нм. Оптические срезы обрабатывали по программе Leica Confocal Software.

Результаты

Культивирование КМЦ в течение 10 сут в гелях с разной концентрацией коллагена. Для выбора оптимальной концентрации гелей мы культивировали КМЦ в гелях с концентрациями коллагена 0.5, 1 и 1.5 мг/мл и анализировали характер организации их сократительного аппарата на 10-е сут культивирования (рис. 1). Этот срок соответствует полной перестройке сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в двухмерных условиях, которая заключается в исчезновении миофибрилл и образовании структур, подобных

стресс-фибриллам немышечных клеток. На указанном сроке культивирования при концентрации коллагена 0.5 мг/мл в КМЦ выявлялись исчерченные миофибриллы, которые занимали практически весь объем клеток, при этом миофибриллы лежали под разными углами друг к другу. Клетки имели полигональную форму с наличием небольших многочисленных отростков. В области отростков исчерченные структуры переходили в равномерно окрашенные пучки (рис. 2, а).

При культивировании в гелях с концентрацией коллагена 1.0 мг/мл на 10-е сут КМЦ имели типичную палочковидную форму с отсутствием отростков. Весь объем клеток был заполнен четко исчерченными миофибриллами. Для клеток на этом сроке была характерна продольная ориентация миофибрилл. Миофибриллы преимущественно располагались параллельно друг другу, при этом наблюдали совпадение исчерченности большинства миофибрилл от одного края клетки до другого (рис. 2, б).

При культивировании в гелях с концентрацией коллагена 1.5 мг/мл в это же время в КМЦ выявлялись поперечно исчерченные миофибриллы. Они заполняли почти весь объем клеток и располагались неупорядоченно. Клетки имели полигональную форму с наличием многочисленных небольших отростков, в которых исчерченные миофибриллы переходили в равномерно окрашиваемые структуры (рис. 1, в).

Из трех вариантов исследуемых гелей на 10-е сут культивирования КМЦ сохраняли только в гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл. Таким образом, для проведения дальнейшего исследования мы использовали коллагеновые гели с указанной концентрацией.

Организация сократительного аппарата КМЦ на разных сроках культивирования в коллагеновом геле с концентрацией коллагена 1 мг/мл. Организация сократительного аппарата КМЦ и морфология клеток на 3, 5, 10, 15 и 20-е сут культивирования в коллагеновом геле с концентрацией не изменялась. На всех исследуемых сроках культивирования подавляющее большинство клеток в гелях имело характерную палочковидную форму с отсутствием отростков (рис. 2). Миофибриллы с четкой поперечной исчерченностью заполняли фактически весь объем клеток и распола-

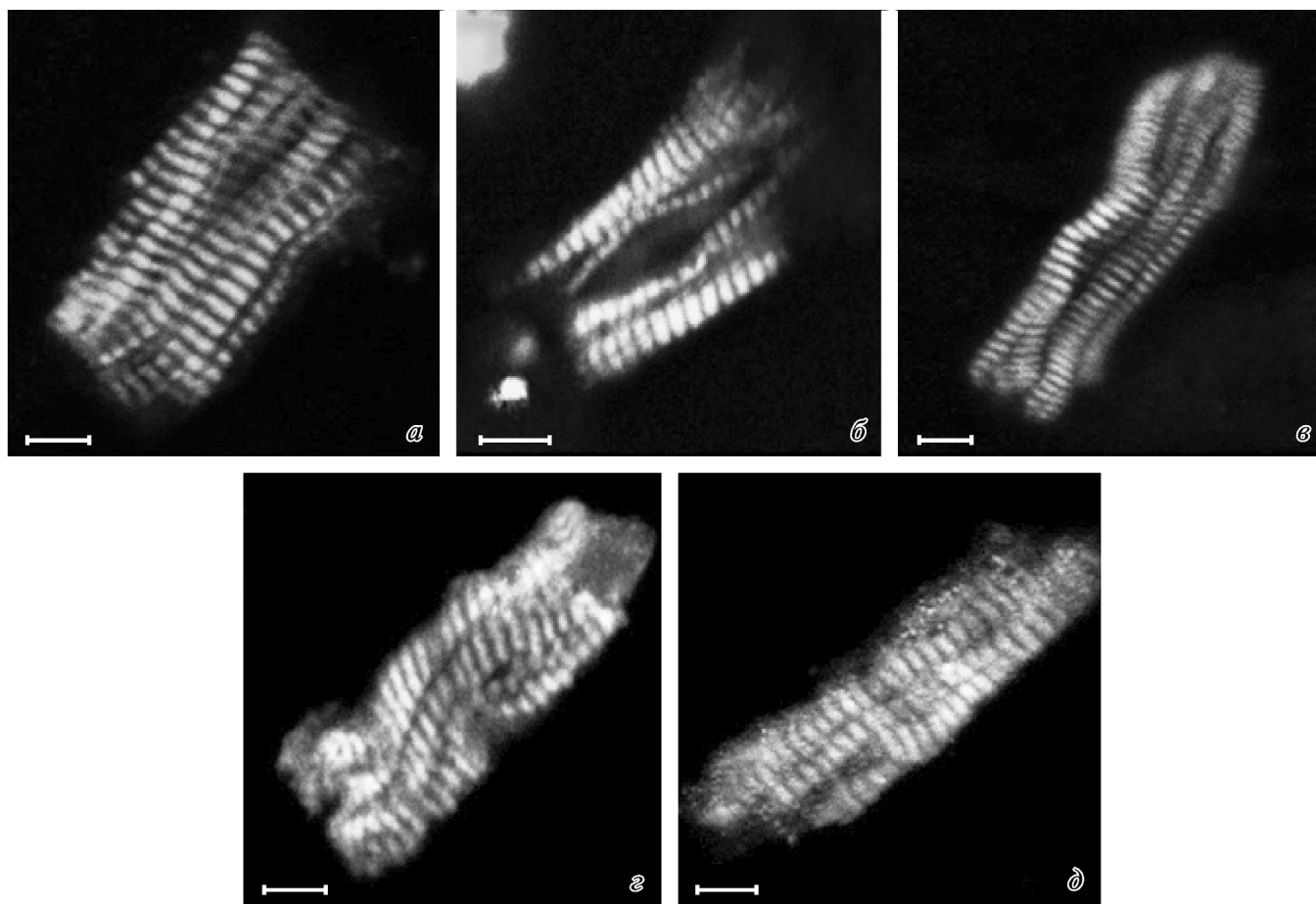


Рис. 2. Кардиомиоциты новорожденных крыс в коллагеновом геле с концентрацией 1 мг/мл на разных сроках культивирования: 3 (а), 5 (б), 10 (в), 15 (з) и 20 (д) сут.

Окраска с помощью родамин-фаллоидина. Масштабные отрезки — 10 мкм.

гались параллельно друг другу. Упорядоченная организация миофибрилл приводила к совпадению исчерченности у большинства миофибрилл от одного края клетки до другого и формированию общего миофибрилярного пласта (рис. 2).

Во всех исследуемых гелях жизнеспособность клеток составляла 75—80 % на всех сроках культивирования.

Обсуждение

Большинство клеток при их выделении из ткани и переводе в культуру в той или иной степени изменяет свою морфологию и свойства, что, вероятно, связано с потерей их естественного микроокружения. Известно, что трехмерные системы культивирования наиболее соответствуют условиям, в которых клетки находятся в организме (Mauch et al., 1988; Eschenhagen et al., 1997; Coker et al., 1999; Zimmermann et al., 2004).

Во всех вариантах исследуемых нами гелей на 10-е сут культивирования в КМЦ сохранялись поперечно исчерченные миофибриллы в отличие от КМЦ на том же сроке в двухмерных системах культивирования (Бильдюг, Пинаев, 2013б). Однако морфология КМЦ, культивируемых в гелях с концентрациями белка 0.5 и 1.5 мг/мл, отличалась от типичной. Клетки имели многочисленные отростки, нехарактерные для КМЦ, находя-

щихся в составе ткани сердца. Кроме того, миофибриллы в клетках были организованы неупорядоченно и переходили в неисчерченные структуры. Такие данные указывают на частичную перестройку сократительного аппарата КМЦ. Ранее нами было показано, что реорганизация сократительного аппарата КМЦ в условиях двухмерного культивирования связана с необходимостью создания оптимального для клеток внеклеточного окружения и синтезом собственных компонентов ВКМ (Бильдюг, Пинаев, 2013а). Возможно, что изменение морфологии КМЦ и перестройка их сократительного аппарата при культивировании в гелях с указанными концентрациями коллагена также связаны с попыткой модифицировать ВКМ, в частности его плотность.

Гели с концентрацией белка 1 мг/мл оказались наиболее подходящими для поддержания естественной организации сократительного аппарата КМЦ. На 10-е сут культивирования, а также на других сроках культивирования КМЦ в этих гелях имели организацию, характерную для них в ткани сердца. Таким образом, в ходе длительного культивирования КМЦ в коллагеновых гелях с концентрацией 1 мг/мл не было перестроек их сократительного аппарата, наблюдаемых при культивировании в двухмерных системах.

Несмотря на полное поддержание исходной организации КМЦ и их жизнеспособность, мы не наблюдали их спонтанных сокращений в коллагеновых гелях. Мы пред-

полагаем, что важным фактором может являться отсутствие механического натяжения гелей. Согласно данным из литературы, натяжение может способствовать сокращению КМЦ в культуре (Eschenhagen et al., 1997; Zimmermann et al., 2004). Кроме того, мы предполагаем, что в поддержании сократительной способности КМЦ могут принимать участие и другие компоненты ВКМ, такие как ламинин, коллагены III и IV и т. д.

Полученные нами данные дают основание предполагать, что трехмерные условия культивирования являются наиболее подходящими для поддержания типичной морфологии и организации сократительного аппарата КМЦ. Тем не менее для получения полноценной модели функционально активных клеток миокарда необходимо продолжить работу по оптимизации трехмерной системы, созданной на основе коллагена I типа.

Список литературы

- Бильдюг Н. Б., Пинаев Г. П. 2013а. Зависимость организации сократительного аппарата кардиомиоцитов от внеклеточного матрикса. Цитология. 55 (10) : 713—724. (Bildjug N. B., Pinaev G. P. 2013a. Extracellular matrix dependence of the cardiomyocyte contractile apparatus organization. Tsitologiya. 55 (10) : 713—724.)
- Бильдюг Н. Б., Пинаев Г. П. 2013б. Влияние ингибитора пролиферации цитозин-арабинозида на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 29 : 36—42. (Bildjug N. B., Pinaev G. P. 2013b. The effect of the proliferation inhibitor cytosine-arabioside on the cardiomyocyte contractile apparatus organization. Cell cultures. Information bulletin. 29 : 36—42.)
- Борисов А. Б., Гончарова Е. И., Пинаев Г. П., Румянцев П. П. 1989. Изменения локализации α -актина и миофибриллогенеза в кардиомиоцитах во время культивирования. Цитология. 31 (6) : 642—646. (Borisov A. B., Goncharova E. I., Pinaev G. P., Rumyanzev P. P. 1989. α -Actinin localization and myofibrillogenesis alterations in cardiomyocytes upon culturing. Tsitologiya. 31 (6) : 642—646.)
- 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.
- Bhana B., Iyer R. K., Chen W. L., Zhao R., Sider K. L., Likhitanichkul M., Simmons C. A., Radisic M. 2010. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells. Biotechnol Bioeng. 105 : 1148—1160.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. J. Biol. Chem. 251 : 6062—6067.
- Coker M. L., Doscher M. A., Thomas C. V., Galis Z. S., Spinale F. G. 1999. Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations. Amer. J. Physiol. 277 : 777—787.
- De Souza R. R. 2002. Aging of myocardial collagen. Biogerontology. 3 : 325—335.
- Engler A. J., Carag-Krieger C., Johnson C. P., Raab M., Tang H. Y., Speicher D. W., Sanger J. W., Sanger J. M., Discher D. E. 2008. Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. J. Cell Sci. 121 : 3794—3802.
- Eschenhagen T., Fink C., Remmers U., Scholz H., Wattchow J., Weil J., Zimmerman W., Dohmen H. H., Schafer H., Bishopric N., Wakatsuki T., Elson E. L. 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. FASEB J. 11 : 683—694.
- Forte G., Pagliari S., Ebara M., Uto K., Tam J. K., Romanazzo S., Escobedo-Lucea C., Romano E., Di Nardo P., Traversa E., Aoyagi T. 2012. Substrate stiffness modulates gene expression and phenotype in neonatal cardiomyocytes in vitro. Tissue Eng. 18 : 1837—1848.
- Gu Y., Ji Y., Zhao Y., Liu Y., Ding F., Gu X., Yang Y. 2012. The influence of substrate stiffness on the behavior and functions of Schwann cells in culture. Biomaterials. 33 : 6672—6681.
- Hopp I., Micheltore A., Smith L. E., Robinson D. E., Bachhuka A., Mierczynska A., Vasilev K. 2013. The influence of substrate stiffness gradients on primary human dermal fibroblasts. Biomaterials. 34 : 5070—5077.
- Huxley H. E. 1953. Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. Biochim biophys. acta. 12 : 387—394.
- Jugdutt B. I. 2003. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord. 3 : 1—30.
- Li X., Huang Y., Zheng L., Liu H., Niu X., Huang J., Zhao F., Fan Y. 2014. Effect of substrate stiffness on the functions of rat bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells in vitro. J. Biomed. Mater. Res. A. 102 : 1092—101.
- Lü D., Luo C., Zhang C., Li Z., Long M. 2014. Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. Biomaterials. 35 : 3945—3955.
- Mauch C., Hatamochi A., Scharffetter K., Krieg T. 1988. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three dimensional collagen gel. Exp. Cell Res. 178 : 493—503.
- 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. Histochem. 100 : 193—202.
- Nag A. C., Cheng M. 1981. Adult mammalian cardiac muscle cells in culture. Tissue Cell. 13 : 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 : 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 Motil. 17 : 313—334.
- Soares C. P., Midlej V., de Oliveira M. E., Benchimol M., Costa M. L., Mermelstein C. 2012. 2D and 3D-organized cardiac cells shows differences in cellular morphology, adhesion junctions, presence of myofibrils and protein expression. PLoS ONE. 7 : e38147.
- Squire J. M. 1974. Symmetry and three-dimensional arrangement of filaments in vertebrate striated muscle. J. Mol. Biol. 90 : 153—60.
- Wang K. 1984. Cytoskeletal matrix in striated muscle: the role of titin, nebulin and intermediate filaments. Adv. Exp. Med. Biol. 170 : 285—305.
- Wang Y., Wang G., Luo X., Qiu J., Tang C. 2012. Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells. Burns. 38 : 414—420.
- Yeung T., Georges P. C., Flanagan L. A., Marg B., Ortiz M., Funaki M., Zahir N., Ming W., Weaver V., Janmey P. A. 2005. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. Cell Motil. Cytoskeleton. 60 : 24—34.
- Zimmermann W. H., Melnychenko I., Eschenhagen T. 2004. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. Biomaterials. 25 : 1639—1647.

CONTRACTILE APPARATUS ORGANIZATION OF CARDIOMYOCYTES
UPON THEIR CULTIVATION IN COLLAGEN GELS

N. B. Bildjug,¹ N. M. Yudintseva, G. P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: relapse@yandex.ru

Cardiomyocytes are known to change their morphology and reorganize the contractile apparatus upon their culturing in 2D culture systems. Therefore, the monolayer cardiomyocyte cultures appear to be a poor model for studying of the biologically important processes in the heart. Present study relates to the searching for the most optimal culture conditions allowing cardiomyocytes to maintain their typical morphology and the native state of contractile apparatus. In this study, we investigated organization of the contractile apparatus of cardiomyocytes when cultured in 3D collagen gels of different density. It has been shown that cardiomyocytes preserve the initial organization of their contractile apparatus during prolonged cultivation in collagen gels at a concentration of 1 mg/ml, whereas partial reorganization of their contractile apparatus is observed at a concentration of 0.5 and 1.5 mg/ml. Thus, cardiomyocytes placed in 3D collagen gels with a protein concentration of 1 mg/ml could be considered as a culture model which approximates to the natural conditions.

Key words: extracellular matrix (ECM), cardiomyocytes (CMC), collagen gel, contractile apparatus.
