

На правах рукописи

БИЛЬДЮГ Наталья Борисовна

**РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕСТРОЕК
СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте цитологии Российской академии наук

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Пинаев Георгий Петрович,
заведующий Отделом клеточных культур
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

доктор биологических наук
Хайтлина София Юрьевна,
ведущий научный сотрудник лаборатории биологии клетки в культуре
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Надеждина Елена Сергеевна,
руководитель группы физиологии цитоскелета
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института белка РАН, Московская область, г. Пушкино, Россия

доктор биологических наук,
Александрова Антонина Юрьевна,
ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский кардиологический научно-производственный комплекс»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в __ часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН
по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д.4.
e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru
сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>
факс: 8 (812) 2973541

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института.
Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Кардиомиоциты (КМЦ) являются функциональными клетками сердца и отвечают за его способность к сокращению. В ходе эмбрионального развития сердца млекопитающих КМЦ активно пролиферируют, но через некоторое время после рождения претерпевают терминальную дифференцировку, которая сопровождается их выходом из клеточного цикла. Дальнейший рост клеток связан в основном с гипертрофией (Erokhina and Rumyantsev, 1986; Naqvi et al., 2014). Неспособность миокарда к самообновлению ставит целый ряд проблем, которые в первую очередь связаны с вопросами регенерации. Кроме того, неспособность КМЦ к делению ограничивает возможность получения стабильной линии этих клеток. Несмотря на огромное количество исследований, направленных на дифференцировку различных клеток в КМЦ, использование дифференцированных КМЦ в качестве модели для фундаментальных, а также прикладных исследований *in vitro* пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных клеток. На сегодняшний день единственной приемлемой моделью для изучения КМЦ *in vitro* является их первичная культура.

О возможности перевода КМЦ в культуру и поддержания их в условиях *in vitro* в течение длительного времени известно довольно давно. Однако при культивировании КМЦ происходят существенные изменения в организации их сократительного аппарата с обратимым преобразованием типичных миофибрилл в неисчерпаемые структуры, напоминающие структуры цитоскелета немышечных клеток. Такие перестройки сопровождаются временной утратой способности КМЦ к сокращению (Nag and Cheng, 1981; Борисов и др., 1989).

Несмотря на то что феномен перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре давно известен, его причины и механизмы до сих пор не изучались. Вместо этого большинство исследователей подбирает условия экспериментов, позволяющие обходить этот процесс. В частности, многие авторы используют в своих исследованиях клетки на ранних сроках культивирования до начала перестройки их сократительного аппарата.

Настоящая работа в целом направлена на изучение процессов, лежащих в основе перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре. Исследование этих процессов может внести существенный вклад в понимание механизмов пластичности сократительных систем клеток, поскольку данная модель является редким примером изменения организации стабильного высококодифференцированного сократительного аппарата мышечных клеток.

Процесс перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре имеет ряд сходных черт со стадиями эмбрионального развития этих клеток, поскольку при восстановлении исходной организации сократительного аппарата КМЦ наблюдается постепенное формирование новых миофибрилл. В свою очередь, некоторыми исследователями было показано, что КМЦ в культуре начинают экспрессировать белки, характерные для ранних стадий эмбрионального развития, в частности, гладкомышечный α -актин (van Bilsen and Chien, 1993; Schaub et al. 1997). В связи с этим данные исследования изоформ актина и анализа корреляции их появления с изменениями в организации сократительных структур могут стать хорошей моделью для изучения миофибриллогенеза в ходе эмбрионального развития. Понимание механизмов, лежащих в основе восстановления миофибриллярной организации КМЦ и их сократительной способности в системе *in vitro*, может позволить в дальнейшем управлять этим процессом и, возможно, найти подходы к созданию более эффективных методов получения дифференцированных КМЦ и способов их оценки. Кроме того, изучение причин перестройки сократительного аппарата КМЦ необходимо для возможности

получения оптимальной системы культивирования, позволяющей КМЦ непрерывно поддерживать миофибриллярную организацию их сократительного аппарата и функциональную активность.

Поскольку перестройка сократительного аппарата КМЦ не наблюдается в нормальной ткани сердца, мы предположили, что она может быть вызвана потерей клетками их естественного микроокружения. В организме фактически все клетки находятся в окружении внеклеточного матрикса (ВКМ), который образует упорядоченную пространственную сеть, на поверхности и внутри которой клетки могут перемещаться и взаимодействовать друг с другом. ВКМ является крайне динамичной системой и постоянно подвергается ремоделированию матриксными металлопротеиназами (ММП).

На сегодняшний день накопилась значительное количество данных, свидетельствующих о влиянии ВКМ на организацию сократительных структур немышечных клеток (Grinnell, 1978). При этом данных о возможном влиянии ВКМ на сократительный аппарат мышечных клеток, в частности, кардиомиоцитов, крайне мало. Известно, однако, что изменение экспрессии белков ВКМ может оказывать существенное влияние на строение и функцию сердца и связано с рядом сердечных заболеваний (Barallobre-Barreiro et al., 2012). В ткани сердца за синтез и ремоделирование ВКМ отвечают фибробласты и клетки эндотелия (Chapman et al., 2003; Camelliti et al., 2005), в то время как КМЦ специализируются на функции сокращения и не участвуют в его формировании.

Поскольку культура КМЦ лишена основных продуцентов ВКМ, мы предположили, что перестройка сократительного аппарата КМЦ может быть вызваны отсутствием ВКМ в системе культивирования. В таком случае восстановление исходной организации должно было бы объясняться появлением необходимых внеклеточных белков. Несмотря на отсутствие данных о способности кардиомиоцитов синтезировать ВКМ, мы предположили, что КМЦ в культуре могут приобретать эту не типичную для них функцию и нарабатывать собственные компоненты ВКМ для возможности восстановления исходной организации сократительного аппарата и возвращения к сократительной активности.

Цели и задачи исследования

Цель настоящего исследования заключалась в определении причин и механизмов перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать стадии перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования;
2. Определить, могут ли различные белки внеклеточного матрикса влиять на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов;
3. Оценить способность кардиомиоцитов синтезировать внеклеточный матрикс на разных сроках культивирования, а также охарактеризовать полученный матрикс;
4. Изучить способность кардиомиоцитов синтезировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы;
5. Определить влияние внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами или сердечными фибробластами, на перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов;
6. Определить влияние трехмерного коллагенового матрикса на перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов;
7. Определить изоформы актина на разных сроках перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В процессе культивирования кардиомиоцитов происходит перестройка их сократительного аппарата, которая характеризуется семью ключевыми стадиями обратимого преобразования миофибрилл в структуры немышечного типа.
2. Кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования синтезируют собственные белки внеклеточного матрикса коллаген и ламинин, причем синтез этих белков коррелирует со стадиями перестройки их сократительного аппарата.
3. Кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования синтезируют внеклеточные матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9, причем количество указанных металлопротеиназ коррелирует со стадиями перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов и количеством коллагена во внеклеточном матриксе.
4. При культивировании кардиомиоцитов на отдельных белках внеклеточного матрикса, а также на матриксе, наработанном сердечными фибробластами или такими же кардиомиоцитами, происходит сокращение периода перестройки их сократительного аппарата.
5. При культивировании кардиомиоцитов в трехмерных 0,1%-ных коллагеновых гелях не происходит перестройки их сократительного аппарата и секреции матриксных металлопротеиназ.
6. В процессе перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов появление гладкомышечного α -актина предшествует преобразованию миофибрилл в структуры немышечного типа, а его подавление предшествует экспрессии сердечной изоформы и восстановлению исходной организации.
7. Наблюдается обратная корреляция между экспрессией гладкомышечного α -актина и синтезом белков внеклеточного матрикса кардиомиоцитами в культуре.

Научная новизна работы

В работе впервые описаны причины и механизмы перестройки сократительного аппарата КМЦ в процессе их культивирования. Обнаружено, что перестройка сократительного аппарата сопровождается временным замещением сердечной изоформы актина на гладкомышечную и изменением функции КМЦ с сократительной на не типичную для них синтетическую. Впервые показана способность КМЦ синтезировать структурные компоненты ВКМ, а также продуцировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы. Впервые обнаружено, что восстановление миофибрилярного аппарата КМЦ в процессе культивирования происходит по мере накопления собственных компонентов ВКМ и сопровождается возобновлением экспрессии сердечной изоформы актина. Таким образом, в работе впервые показано влияние ВКМ на организацию сократительного аппарата КМЦ и выявлена обратная корреляция между гладкомышечной изоформой актина и синтезом компонентов ВКМ в процессе перестройки сократительного аппарата КМЦ. Полученные данные предполагают существование петли отрицательной обратной связи между ВКМ и динамикой сократительной системы КМЦ.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты нашей работы указывают на высокую степень пластичности сократительного аппарата КМЦ и позволяют рассматривать ВКМ в качестве важного регулятора не только динамического цитоскелета, но и сложноорганизованной сократительной системы мышечных клеток. Подробно описанный нами процесс перестройки сократительного аппарата КМЦ с преобразованием миофибрилл в структуры немышечного типа и координированной сменой изоформ актина указывает

на то, что разные типы организации сократительной системы зависят не только и не столько от происхождения клеток, сколько от факторов микроокружения.

Данные, полученные в настоящей работе, позволяют говорить о механизмах регуляции сократительного аппарата КМЦ через петлю отрицательной обратной связи, включающую ВКМ и гладкомышечную изоформу актина, и рассматривать гладкомышечный α -актин как регулятор восстановления нормального фенотипа КМЦ.

Кроме того, наши результаты являются дополнительным подтверждением уже имеющихся на сегодняшний день данных о том, что гладкомышечный α -актин несовместим с миофибриллярной организацией сократительного аппарата и, таким образом, не может замещать другие изоформы актина без изменения функции.

Результаты настоящей работы показывают, что в ходе культивирования КМЦ проходят стадии, по многим параметрам соответствующие стадиям эмбрионального развития. В связи с этим данные о механизме обратной регуляции между гладкомышечным α -актином и ВКМ в процессе восстановления исходной организации сократительного аппарата КМЦ в культуре можно использовать для изучения роли ВКМ в процессе миофибриллогенеза. Кроме того, эти данные можно применять в разработке более эффективных методов кардиогенной дифференцировки *in vitro*.

С другой стороны, описанные нами механизмы перестройки сократительного аппарата КМЦ на начальных стадиях культивирования могут быть полезны для изучения патологических процессов в сердце, поскольку изменения, которые наблюдаются при различных сердечных заболеваниях, часто также сопровождаются появлением гладкомышечного α -актина и деформацией ВКМ.

Кроме того, данные по культивированию КМЦ в коллагеновых гелях, полученные в настоящей работе, предлагают систему культивирования с непрерывным поддержанием исходной организации сократительного аппарата КМЦ, которая при должной оптимизации может обеспечить получение гомогенной культуры функционально активных КМЦ для ее использования в качестве модели для фундаментальных и прикладных исследований.

Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого и могут быть использованы в общих и специальных курсах лекций биологических факультетов других ВУЗов.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ: 7 статей в рецензируемых журналах, в том числе 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов докладов конференций. Основные научные результаты диссертации были представлены и обсуждены на Международном симпозиуме «Биологическая подвижность», г. Пущино, Россия, 2016 г.; II Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет», Санкт-Петербург, 2015 г.; 44-й Европейской мышечной конференции, Варшава, Польша, 2015 г.; 18-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2014 г.; Всероссийском симпозиуме и школе-конференции для молодых ученых «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург, 2013 г.; III Съезде Общества клеточной биологии, Санкт-Петербург, 2012 г.; III Конференции молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, 2012 г.; 12-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 2008 г., г. Пущино.

Вклад автора

Все основные результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в представленную работу и опубликованные в виде статей, изложены самим автором и обсуждались совместно с соавторами и научными руководителями.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение», а также выводов и списка цитируемой литературы, включающего 430 источников, из них 423 – на английском языке. Работа содержит 26 рисунков и 1 таблицу.

Финансовая поддержка работы

Работа частично поддержана грантом РФФ № 14-50-00068 и грантом РФФНШ-7852.2006.4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Получение первичной культуры КМЦ. Работу проводили на беспородных лабораторных крысах. КМЦ выделяли из желудочков сердец новорожденных 3–6-суточных животных с помощью метода протеолитической диссоциации с использованием раствора трипсина (Биолот, Россия; 1 мг/мл) и коллагеназы I типа (коллагеназа краба, «Биолот», Россия; 0,5 мг/мл). Для освобождения культуры от клеток эндотелия и клеток крови полученную суспензию клеток сердца центрифугировали при 150 g. Для того чтобы отделить более адгезивные фибробласты от медленно прикрепляющихся КМЦ, использовали метод селективной адгезии. В результате получали отдельные культуры КМЦ и сердечных фибробластов. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (10%, Gibco, США) и гентамицина (Биолот, Россия, 50 мкг/мл). Культуру КМЦ дополнительно обрабатывали ингибитором синтеза ДНК цитозин-арабинозидом (Sigma-Aldrich США, 3 мкг/мл) для предупреждения пролиферации возможно оставшихся в незначительном количестве фибробластов.

2. Получение проб ВКМ, наработанного кардиомиоцитами или сердечными фибробластами. Для выделения ВКМ с минимальными повреждениями культуру КМЦ или сердечных фибробластов инкубировали в течение 2 ч при 4 °С в растворе PBS, а затем в течение 30 мин при 37 °С в 0,02%-ном растворе Версена (Биолот, Россия). Клетки удаляли путем осторожного многократного пипетирования. Белки ВКМ снимали с подложки в буфере для проб Лэммли (Laemmli, 1970) при помощи резинового скребка и инкубировали при 90 °С.

3. Культивирование кардиомиоцитов на белках ВКМ. КМЦ наносили на стекла, предварительно обработанные раствором фибронектина (0,02 мг/мл; Sigma-Aldrich, США) или ламинина 2/4 (0,02 мг/мл, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), или на стекла, покрытые ВКМ от сердечных фибробластов или кардиомиоцитов, полученные в результате снятия клеток с подложки.

4. Культивирование КМЦ в коллагеновых гелях. Для приготовления коллагеновых гелей использовали коллаген I типа, полученный по стандартной методике (Chandrakasan et al., 1967), стерильный 0,34 М NaOH (для подведения pH до 7,0) и концентрированную (10×) питательную среду 199 (Sigma-Aldrich, США). В полученную смесь добавляли суспензию КМЦ с достижением необходимой конечной концентрации коллагена. Суспензию с клетками наносили на покровные стекла и помещали в инкубатор. После полимеризации коллагена клетки в гелях культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с эмбриональной телячьей сывороткой (10%, Gibco, США) и гентамицином (Биолот, Россия, 50 мкг/мл) с добавлением цитозин-арабинозида.

5. Флуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия. Клетки фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида и обрабатывали 0,1%-ным раствором Triton X-100. Для выявления

гладкомышечного актина использовали моноклональные мышинные антитела против гладкомышечной изоформы α -актина (Sigma-Aldrich, США) и вторые поликлональные кроличьи антитела против IgG мыши (Sigma-Aldrich, США), конъюгированные с красителем TRITC. Препараты, на которых не выявлялось структур, окрашенных другими красителями, дополнительно окрашивали ДНК-красителем DAPI для определения положения клеток. Для выявления всех актиновых структур клетки обрабатывали раствором родамин-фаллоидина (Sigma-Aldrich, США). Внеклеточный коллаген окрашивали с помощью поликлональных кроличьих антител к коллагену I типа (Chemicon, США) и вторых поликлональных козьих антител против IgG кролика (Sigma-Aldrich, США), конъюгированных с красителем FITC, без предварительной обработки клеток раствором Triton X100. Готовые препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LEICA TCS SL (Leica, Германия) с использованием аргонового лазера (488 нм) и He-Ne лазера (543 нм). Оптические срезы обрабатывали с помощью программы Leica Confocal Software (Leica, Германия). Люминесценцию красителя DAPI (синяя область) регистрировали на микроскопе LSM 5 Pascal с использованием ртутной лампы.

6. Получение клеточных лизатов. КМЦ на разных сроках культивирования снимали с чашек Петри с помощью смеси 0,25%-ного раствора трипсина (Биолот, Россия) и 0,02%-ного раствора Версена (Биолот, Россия) в отношении 1:1. Клетки лизировали на льду в 1 мл лизирующего буфера, содержащего 1% Triton X-100, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА и 1% смеси ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, США), и центрифугировали при 500 g в течение 10 мин. К супернатантам добавляли буфер для проб Лэммли и нагревали в течение 5 мин при 90 °С. Концентрацию белка в лизатах определяли с помощью метода Дот-блоттинга. В качестве стандарта концентрации белка использовали бычий сывороточный альбумин в серийных разведениях.

7. Электрофоретический анализ и Вестерн-блоттинг. Белки клеточных лизатов или проб ВКМ разделяли методом электрофореза в полиакриламидных гелях в денатурирующих условиях в присутствии SDS (Laemmli, 1970) при концентрации полиакриламида в разделяющем геле 7,5 или 10 %. Для анализа общего содержания белков гели после электрофореза фиксировали в растворе, содержащем 50 % этанола и 10 % уксусной кислоты, и окрашивали Кумасси R-250 (Sigma-Aldrich, США) или раствором нитрата серебра (Proteosilver™ Plus Silver Stain kit, Sigma-Aldrich, США). Для анализа с помощью Вестерн-блоттинга разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на PVDF-мембраны Immobilon-P (Sigma-Aldrich, США) с помощью системы для мокрого переноса (Bio-Rad, США) в трис-глициновом буфере (pH 8,3), содержащем 10 % метанола и 0,1 % SDS. Мембраны окрашивали либо моноклональными мышинными антителами против гладкомышечного α -актина (Sigma-Aldrich США) или коллагена I (Sigma-Aldrich США), либо поликлональными крысиными антителами против ламинина (Sigma-Aldrich США). В качестве вторых антител использовали козы антитела против IgG крысы (для ламинина) или козы антитела против IgG мыши (для гладкомышечного α -актина и коллагена I), конъюгированные с пероксидазой хрена (Pierce, США). Для выявления пероксидазной активности использовали субстрат SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific, США). Хемилюминесцентное излучение регистрировали при помощи системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). Для проведения количественного анализа гели и мембраны сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One.

8. Идентификация ММП методом зимографии. Для определения ММП в кондиционированной клетками среде использовали метод зимографии с желатином. Пробы выдерживали в буфере для проб (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS) и анализировали при помощи SDS-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии 0,5 мг/мл желатина в разделяющем геле. По окончании

электрофореза гель отмывали 2,5%-ным раствором Triton-X100 для удаления SDS и инкубировали в буфере, содержащем 5 мМ CaCl₂ и 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2–7,4, при 37 °С для ренатурации протеаз и протекания протеолитических реакций. После инкубации гель фиксировали в растворе, содержащем 25 % изопропанола и 10 % уксусной кислоты, и окрашивали Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich, США). Для проведения количественного анализа гели сканировали и полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0.

9. Экстракция РНК, синтез кДНК и ПЦР-реакции. Тотальную клеточную РНК экстрагировали с использованием реагента Trizol (Invitrogen Life Technologies, США). Концентрацию оценивали с помощью флуориметра Qubit® 2.0 (Life Technologies, США). Для устранения возможных примесей ДНК пробы инкубировали с ДНКазой I (Sigma-Aldrich, США). Для синтеза кДНК использовали 1 мкг РНК (набор для синтеза комплементарной кДНК, Thermo Scientific, США). Полимеразную цепную реакцию осуществляли с использованием системы для ПЦР Terzig PCR system (DNA Technologies, США). В реакциях ПЦР использовали специфичные пары праймеров для сердечного α-актина (ACTA1-F (5'-3') CTCTTGTGTGTGACAACGGC; ACTA1-R (5'-3') CCCATACCGACCATGACACC) и гладкомышечного α-актина (ACTA2-F (5'-3') CATCCGACCTTGCTAACGGA; ACTA2-2R (5'-3') GTCCAGAGCGACATAGCACA). Продукты ПЦР наносили на 2%-ный агарозный гель, окрашивали бромидом этидия и визуализировали с помощью системы Gel Doc XR (Bio-Rad). В качестве внутреннего контроля использовали экспрессию гена «домашнего хозяйства» β-миоглобина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Организация сократительного аппарата КМЦ на разных сроках культивирования. В процессе культивирования КМЦ наблюдались разнообразные варианты организации структур их сократительного аппарата. Однако на каждом конкретном сроке выявлялось от 75 до 95 % клеток с одинаковым типом организации сократительных структур. Такой тип организации считали характерным для данного срока культивирования. Свежевыделенные КМЦ оставались в течение первых суток в суспензии и имели характерную палочковидную форму. Прикрепление клеток к подложке начиналось примерно на вторые сутки культивирования, при этом КМЦ сохраняли палочковидную или полигональную форму. Наблюдалось появление небольших псевдоподий, которые, вероятно, соответствовали участкам прикрепления клеток к подложке. КМЦ в целом сохраняли типичную организацию сократительного аппарата, характерную для этих клеток в ткани сердца. Миофибриллы заполняли фактически весь объем клеток и располагались вдоль главной оси (Рис. 1, а). КМЦ начинали сокращаться на 2–3-и сутки культивирования. На 4-е сутки начиналась перестройка их сократительного аппарата. По краям клеток появлялись выраженные отростки, в области которых исчерченные структуры постепенно переходили в равномерно окрашенные пучки, которые по морфологии напоминали стресс-фибриллы, характерные для сократительных систем немышечных клеток (Рис. 1, б). Несмотря на сохраняющиеся миофибриллы, большинство КМЦ на этом сроке утрачивало способность к сокращению. На 5–6-е сутки культивирования лишь небольшие фрагменты миофибрилл сохранялись в центральной части КМЦ. Остальной объем клеток был заполнен неисчерченными структурами, напоминающими стресс-фибриллы немышечных клеток (Рис. 1, в). КМЦ на этом сроке распластывались и увеличивались в размере. На 8–10-е сутки культивирования наблюдались максимальные изменения сократительного аппарата КМЦ. На этом сроке исчерченные миофибриллы полностью исчезали. Все тело клеток было заполнено беспорядочными или упорядоченными тяжами непрерывно окрашиваемых филаментов (Рис. 1, г). Такая организация напоминала сложную систему цитоскелета в немышечных клетках. Описанное

состояние сократительного аппарата сохранялось до 13-х суток культивирования. На 14–15-е сутки сократительный аппарат КМЦ все еще находился в перестроенном состоянии, однако наблюдалось появление бусинообразных структур, предшествующих формированию саркомеров миофибрилл (Рис. 1, д). На 16–18-е сутки в центральной части клеток выявлялись заново образованные миофибриллы, которые непосредственно переходили в стресс-фибриллоподобные структуры на периферии клеток. На данном этапе наблюдалось восстановление способности КМЦ к спонтанным сокращениям (Рис. 1, е). К 20–22-м суткам культивирования можно было наблюдать фактически полное восстановление миофибриллярного аппарата КМЦ. Миофибриллы снова заполняли практически весь объем клеток (Рис. 1, ж), КМЦ интенсивно сокращались. Однако клетки на этом сроке отличались от КМЦ, свежевыделенных из ткани сердца. Они были сильно распластаны и имели не типичную для КМЦ форму с отсутствием продольной оси и общего миофибриллярного пласта. Клетки имели отростки, в которых сохранялись равномерно окрашиваемые актиновые структуры. Эти отростки, по всей видимости, соответствовали участкам прикрепления КМЦ к подложке. Вероятно, такая организация являлась оптимальной и единственной возможной для КМЦ в новых для них двумерных условиях культивирования и позволяла им удерживаться на подложке при поддержании интенсивной сократительной активности.

Таким образом, в процессе монослойного культивирования КМЦ наблюдались существенные изменения в организации их сократительного аппарата, которые заключались в постепенном преобразовании миофибрилл в структуры, напоминающие сократительные структуры немышечных клеток, и последующем восстановлении исходной миофибриллярной организации. Для удобства дальнейшего изучения этого процесса мы выделили семь ключевых стадий перестройки сократительного аппарата КМЦ, каждой из которых соответствует конкретный временной диапазон (Таблица 1).

Таблица 1. Стадии перестройки сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования.

Стадия	Сутки культивирования	Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов
1	2–3	Исходная организация; сохраненный миофибриллярный аппарат
2	4	Начало перестройки; появление неисчерченных структур на периферии
3	5–7	Частичная перестройка; фрагменты миофибрилл сохраняются только в центральной части клеток
4	8–13	Полная перестройка; миофибриллы полностью замещаются стресс-фибриллоподобными структурами
5	14–15	Предшествующий восстановлению этап; появление бусинообразных структур, предшествующих формированию миофибрилл
6	16–18	Начало восстановления; фрагменты миофибрилл появляются в центральной части клеток
7	19–22	Полное восстановление; миофибриллы заполняют фактически весь объем клеток, неисчерченные структуры сохраняются только в отростках

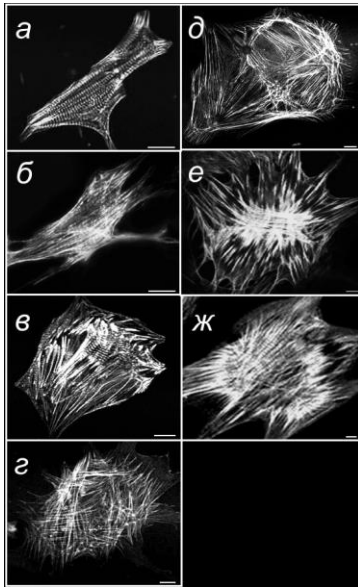


Рис. 1. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования. Представлены фотографии КМЦ на разных сроках культивирования, соответствующих стадиям перестройки их сократительного аппарата. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. а – Стадия 1; б – Стадия 2; в – Стадия 3; г – Стадия 4; д – Стадия 5; е – Стадия 6; ж – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Подробно описанная в настоящей работе перестройка сократительного аппарата КМЦ с преобразованием миофибрилл в структуры, напоминающие сократительные структуры немышечных клеток, свидетельствует о высокой степени пластичности сложноорганизованной сократительной системы КМЦ вопреки существующим представлениям о стабильности сократительного аппарата мышечных клеток. Интересно, что на переходных стадиях перестройки можно наблюдать одновременное присутствие в клетках миофибрилл и стресс-фибриллоподобных структур, что свидетельствует о возможности сосуществования двух типов организации сократительной системы в пределах одной клетки и может указывать на общие принципы их регуляции. Обратимый характер перестройки с восстановлением исходной организации сократительного аппарата говорит о том, что изменения, наблюдаемые в процессе культивирования КМЦ, в целом отражают процесс успешной адаптации клеток к новым для них условиям.

2. Влияние отдельных белков ВКМ на перестройку сократительного аппарата КМЦ в культуре.

Поскольку перестройка сократительного аппарата КМЦ не происходит в нормальной ткани сердца, мы предположили, что она может быть вызвана потерей клетками их естественного микроокружения, в частности, ВКМ. Изменение организации сократительных структур под влиянием ВКМ показано для многих немышечных клеток, однако данных о влиянии ВКМ на сократительную систему мышечных клеток крайне мало. В связи с этим необходимо было проверить, может ли ВКМ оказывать влияние на организацию сократительного аппарата КМЦ. Для этого клетки культивировали на отдельных белках ВКМ. Для использования в качестве подложки были выбраны ламинин и фибронектин, поскольку известно, что эти белки влияют на пространственную организацию сократительных структур в немышечных клетках (Арэ и др., 1999; Петухова и др., 2004).

На сроке, соответствующем Стадии 1 перестройки сократительного аппарата контрольных КМЦ (КМЦ, культивируемых без добавления белков ВКМ), клетки как на фибронектине, так и на ламинине сохраняли миофибриллярную организацию (Рис. 2, а; Рис. 3, а), что соответствовало организации сократительного аппарата в контрольных клетках на этом сроке. На сроке, соответствующем Стадии 3, миофибриллы все еще занимали значительный объем клеток и частично сохраняли упорядоченность в отличие от контрольных клеток, в которых на этом сроке сохранялись лишь небольшие фрагменты миофибрилл. На периферии КМЦ исчерченные структуры постепенно переходили в равномерно окрашенные филаменты (Рис. 2, б; Рис 2, б). На сроке, соответствующем

Стадии 4, наблюдались максимальные изменения сократительного аппарата, как и в случае контрольных КМЦ. Все тело клеток было заполнено неисчерченными структурами с полным отсутствием миофибрилл (Рис. 2, в; Рис. 3, в). Однако на сроке, соответствующем Стадии 5, в КМЦ, культивируемых на фибронектине и ламинине, уже наблюдалось большое количество заново образованных миофибрилл, которые заполняли основной объем клеток. При этом на периферии еще сохранялись стресс-фибриллоподобные структуры, заходящие в псевдоподии. Такое состояние соответствовало фактически полному восстановлению сократительного аппарата КМЦ (Рис. 2, г; Рис. 3, г). На сроке, соответствующем Стадии 7, клетки в целом не отличались от контрольных (Рис. 2, д; Рис. 3, д). Таким образом, при культивировании КМЦ на фибронектине или ламинине происходило сокращение периода перестройки их сократительного аппарата, что указывает на влияние белков ВКМ на динамику сократительных структур культивируемых КМЦ. В целом, эти данные свидетельствуют о том, что ВКМ является важным регулятором не только динамического цитоскелета немышечных клеток, но и сократительного аппарата мышечных клеток, и говорят в пользу нашего предположения о том, что описанная перестройка может быть вызвана отсутствием ВКМ.

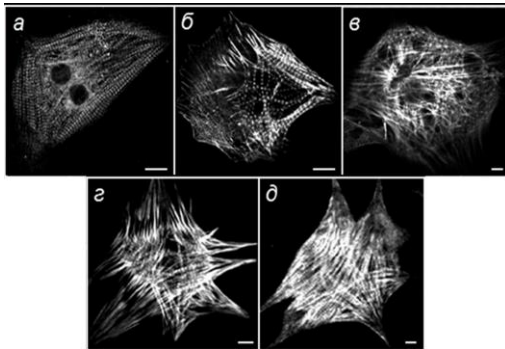


Рис. 2. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на фибронектине. Представлены фотографии КМЦ на разных сроках культивирования на фибронектине. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в отсутствие белков ВКМ. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. а – Стадия 1; б – Стадия 3; в – Стадия 4; г – Стадия 5; д – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

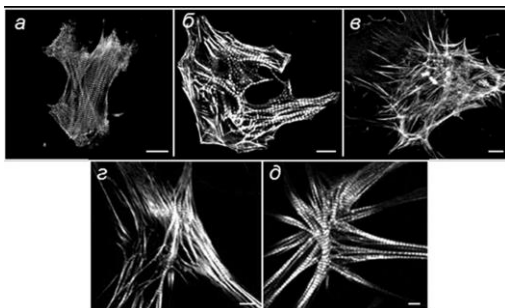


Рис. 3. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на ламинине 2/4. Представлены фотографии КМЦ на разных сроках культивирования на ламинине 2/4. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в отсутствие белков ВКМ. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. а – Стадия 1; б – Стадия 3; в – Стадия 4; г – Стадия 5; д – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

3. Синтез белков ВКМ кардиомиоцитами в культуре. Если отсутствие ВКМ может являться причиной перестройки сократительного аппарата КМЦ в культуре, то его восстановление должно объясняться появлением необходимых компонентов ВКМ. В настоящей работе использовалась чистая культура КМЦ, не содержащая немышечные клетки, которые являются продуцентами ВКМ в ткани. В связи с этим мы предположили, что КМЦ в культуре способны сами нарабатывать компоненты ВКМ для возможности восстановления исходной организации их сократительного аппарата и возвращения к сократительной активности. Поскольку способность КМЦ синтезировать белки ВКМ ранее не была описана, необходимо было проверить наличие ВКМ в культуре КМЦ на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки их сократительного аппарата. С помощью

электрофоретического анализа в культуре КМЦ был выявлен ВКМ, белковый состав которого фактически не различался на разных сроках (Рис. 4), однако наблюдалось изменение общего количества белков, а также соотношения между некоторыми из них. Общее количество белков ВКМ постепенно увеличивалось от Стадии 1 к Стадии 6 перестройки сократительного аппарата КМЦ, при этом на Стадии 6, которая соответствует началу восстановления исходной организации сократительного аппарата и возобновлению сокращений в культуре, наблюдалось максимальное накопление белков. На Стадии 7, соответствующей восстановлению миофибриллярного аппарата, наблюдалось снижение общего количества ВКМ (Рис. 4).

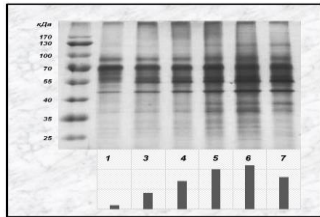


Рис. 4. Синтез внеклеточного матрикса кардиомиоцитами в культуре. Представлены результаты электрофоретического анализа нарабатываемого кардиомиоцитами ВКМ на Стадиях 1, 3, 4, 5, 6 и 7 перестройки их сократительного аппарата. Числовые значения слева соответствуют положению маркеров молекулярного веса (кДа). Результаты денситометрии представлены в виде гистограммы.

Для того чтобы охарактеризовать нарабатываемый кардиомиоцитами ВКМ, необходимо было проверить наличие в нем основных компонентов, характерных для ВКМ сердца – коллагена I и ламинина. Для выявления динамики указанных белков в процессе культивирования КМЦ проводили их анализ с помощью Вестерн-блоттинга на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата. С помощью антител, специфичных к ламинину, были выявлены фрагменты этого белка в области между 70 и 55 кДа. Поскольку условия проведения электрофореза и Вестерн-блоттинга полностью соответствовали условиям для анализа как полноразмерных белков ВКМ, так и их фрагментов, мы считаем, что выявление фрагментов ламинина в ВКМ от кардиомиоцитов объясняется фрагментацией полноразмерных белков в процессе получения проб ВКМ. Контроль переноса белков, а также высокая специфичность антител исключает возможность потери полноразмерного ламинина в процессе его выявления. В связи с этим мы считаем, что результаты выявления фрагментов ламинина полностью отражают динамику накопления ламинина в ВКМ, нарабатываемом кардиомиоцитами. По результатам Вестерн-блоттинга наблюдалось постепенное повышение количества ламинина от Стадии 3, соответствующей началу перестройки сократительного аппарата КМЦ, к Стадии 4 (стадии максимальной перестройки) и от Стадии 4 к Стадии 5, которая предшествует началу восстановления миофибриллярного аппарата (Рис. 5).

С помощью антител, специфичных к коллагену I типа, были выявлены фрагменты этого белка в области между 55 и 35 кДа на разных стадиях перестройки сократительного аппарата КМЦ. Как и в случае ламинина, мы считаем, что образование фрагментов коллагена объясняется фрагментацией полноразмерного белка в процессе получения проб ВКМ и что результаты выявления фрагментов коллагена полностью отражают динамику накопления этого белка в ВКМ, нарабатываемом кардиомиоцитами. С помощью Вестерн-блоттинга была выявлена сходная с ламинином динамика накопления коллагена от Стадии 3 к Стадии 4 и от Стадии 4 к Стадии 5 перестройки сократительного аппарата КМЦ. Максимальная продукция коллагена (Стадия 5) предшествовала началу восстановления миофибриллярного аппарата. Анализ коллагена проводили также на последней стадии перестройки (Стадии 7), когда миофибриллярный аппарат клеток восстановлен. На этом сроке наблюдалось небольшое снижение количества коллагена (Рис. 6).

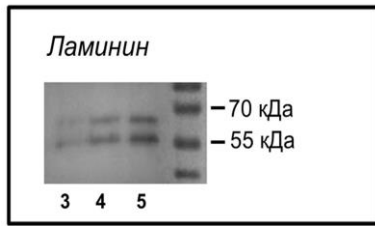


Рис. 5. Синтез ламинина кардиомиоцитами в культуре. Представлены результаты анализа ВКМ, нарабатанного кардиомиоцитами, с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против ламинина. Антитела выявили фрагменты ламинина в области между 70 и 55 кДа на Стадиях 3, 4 и 5 перестройки сократительного аппарата КМЦ. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса.

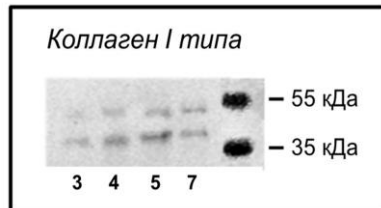


Рис. 6. Синтез коллагена кардиомиоцитами в культуре. Представлены результаты анализа ВКМ, нарабатанного кардиомиоцитами, с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против коллагена I типа. Антитела выявили фрагменты коллагена в области между 55 и 35 кДа на Стадиях 3, 4, 5 и 7 перестройки сократительного аппарата КМЦ. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса.

Для оценки распределения коллагена во внеклеточном пространстве проводили окраску культуры КМЦ с помощью антител против коллагена I типа без предварительной обработки клеток реагентом, обеспечивающим проникновение антител внутрь клеток. На сроке, соответствующем Стадии 3 перестройки сократительного аппарата КМЦ, наблюдали диффузные включения коллагена во внеклеточном пространстве (Рис. 7, а). На Стадии 4 выявлялись структуры, включающие короткие коллагеновые фибриллы (Рис. 7, б). На Стадии 5 наблюдали образование выраженного коллагенового матрикса во внеклеточном пространстве (Рис. 7, в).

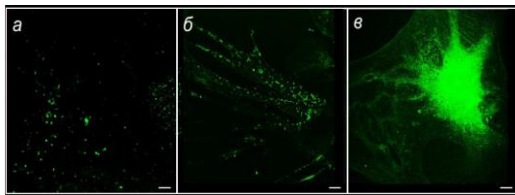


Рис. 7. Внеклеточный коллаген в культуре кардиомиоцитов на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата. Представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания внеклеточного коллагена I в культуре КМЦ. а – Стадия 3; б – Стадия 4; в – Стадия 5. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Данные электрофоретического анализа и Вестерн-блоттинга, полученные в настоящей работе, а также результаты иммунофлуоресцентной окраски коллагена свидетельствуют о том, что КМЦ при помещении в культуру начинают нарабатывать собственный ВКМ. Это первые данные, показывающие способность КМЦ синтезировать структурные компоненты ВКМ. Поскольку на сроках, которые соответствуют интенсивной наработке ВКМ, кардиомиоциты не сокращаются, можно говорить о временной смене их функции с сократительной на не типичную для них секреторную с изменением организации их сократительного аппарата. Мы считаем, что перестройка с преобразованием миофибрилл в структуры немышечного типа является необходимым условием для возможности синтеза кардиомиоцитами компонентов ВКМ, поскольку сложноорганизованный миофибриллярный аппарат, занимающий основной объем клеток, может препятствовать протеканию активных синтетических процессов. Поскольку максимальное накопление ВКМ предшествует возвращению клеток к исходной организации их сократительного аппарата, мы считаем, что нарабатанный кардиомиоцитами к этому сроку ВКМ является необходимым и достаточным для возможности восстановления миофибриллярной системы. Снижение количества ВКМ по результатам электрофореза и Вестерн-блоттинга на сроке, соответствующем восстановлению сократительного

аппарата КМЦ и возобновлению сокращений, подтверждает снижение синтетической активности в клетках и, соответственно, их возвращение к исходной функции.

6. Матриксные металлопротеиназы на разных сроках культивирования КМЦ. ВКМ в ткани сердца является крайне динамичной системой и постоянно подвергается ремоделированию матриксными металлопротеиназами. В сердечной ткани ключевую роль в синтезе ММП играют фибробласты (Herron et al., 1986). Кроме того, ММП синтезируются эндотелиальными и гладкомышечными клетками (Spinale et al., 1993; Camelliti et al., 2005). Однако на сегодняшний день существует крайне мало литературных данных, описывающих продукцию ММП кардиомиоцитами, и полностью отсутствуют данные, указывающие на секрецию кардиомиоцитами ММП во внеклеточное пространство. Поскольку в культуре КМЦ отсутствуют мышечные клетки, необходимо было исследовать способность КМЦ продуцировать собственные внеклеточные ММП в процессе культивирования. Для определения ММП на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ, использовали метод зимографии с желатином, основанный на способности ММП к ренатурации после SDS-ПААГ-электрофореза, приводящей к расщеплению желатина в той зоне геля, в которой находится ММП. При этом в качестве источника ММП использовали среду, кондиционированную КМЦ. На всех исследуемых сроках была обнаружена желатиназная активность в области между 100 и 60 кДа (Рис. 8, а), что соответствует протеолитической активности ММП-9 и ММП-2 (Woessner, 1991; Werb and Alexander, 1993). Область 92 кДа соответствует ММП-9 (Woessner, 1991; Werb and Alexander, 1993). Наблюдалось небольшое повышение желатиназной активности в этой области от Стадии 3 к Стадии 4 перестройки (Рис. 8, а, б). Поскольку ММП-9 является металлопротеиназой, характерной для реакции на стресс и воспаление (Koivukangas et al., 1994; Hsieh et al., 2012), мы полагаем, что ее накопление на ранних сроках культивирования КМЦ связано с адаптацией клеток к непривычным для них условиям в культуре. Указанные сроки соответствуют реорганизации сократительного аппарата КМЦ. На Стадии 5, которая предшествует началу восстановления сократительного аппарата КМЦ, и на Стадии 7, которая соответствуют полному восстановлению миофибриллярного аппарата КМЦ и их сокращений в культуре, наблюдалось снижение желатиназной активности в этой области (Рис. 8, а, б). Полученные данные согласуются с данными литературы о том, что подавление ММП-9 улучшает сократительную способность КМЦ (Romanic et al., 2002; Mishra et al., 2010).

Желатиназная активность в области 70–60 кДа соответствует активности ММП-2, неактивная форма которой (проММП-2) имеет молекулярную массу 72 кДа, а активированная форма – молекулярную массу 66 кДа (Dickson and Warburton, 1992). Желатиназная активность ММП-2 на всех исследуемых сроках культивирования значительно превышала контрольный уровень (Рис. 8, в). Наблюдалось постепенное повышение активности в данной области от Стадии 3 к Стадии 4 и от Стадии 4 к Стадии 5, которая предшествует началу восстановления сократительного аппарата КМЦ в культуре. Такая динамика коррелирует с накоплением внеклеточного коллагена по результатам Вестерн-блоттинга и может объясняться необходимостью его укладки – данные иммунофлуоресцентного анализа подтвердили формирование выраженных коллагеновых структур во внеклеточном пространстве в культуре КМЦ. На Стадии 7, соответствующей восстановлению миофибриллярного аппарата КМЦ, активность в данной области снижалась (Рис. 8, а, в), что соответствует снижению количества коллагена и, вероятно, связано с возвращением клеток к сократительной функции и прекращением синтетической активности.

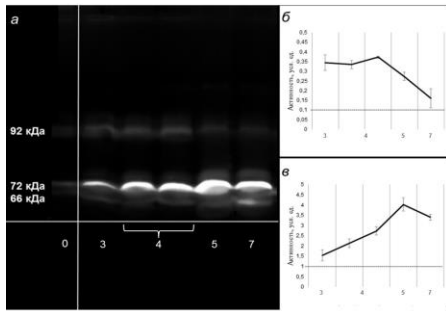


Рис. 8. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 в культуре кардиомиоцитов.

а – Зимограмма среды, кондиционированной КМЦ, на разных сроках перестройки их сократительного аппарата. Уровень ММП в контроле (в полной питательной среде для КМЦ до начала культивирования) соответствует точке 0. Молекулярные массы 92, 72 и 66 кДа соответствуют ММП-9, неактивной и активированной форме ММП-2 соответственно; б – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-9. Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-9; в – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-2. Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-2.

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что КМЦ в процессе культивирования синтезируют внеклеточные матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9, причем количество указанных металлопротеиназ коррелирует со стадиями перестройки их сократительного аппарата.

7. Организация сократительного аппарата КМЦ при их культивировании на матриксе от таких же КМЦ и матриксе от сердечных фибробластов. Для того чтобы проверить, является ли ВКМ, наработанный самими КМЦ, достаточным для поддержания типичной организации их сократительного аппарата, свежесывленные клетки наносили и культивировали на ВКМ, полученном от таких же КМЦ после их длительного культивирования, и проводили анализ сократительных структур культивируемых КМЦ на сроках, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата контрольных КМЦ (Рис. 9, а-д). На сроке, соответствующем Стадии 3, все еще сохранялась миофибриллярная организация, неисчерченные структуры выявлялись только на периферии клеток (Рис. 9, б). На сроке, соответствующем Стадии 4, сократительный аппарат полностью перестраивался (Рис. 9, в), но уже на Стадии 5 происходило восстановление исходной организации сократительного аппарата КМЦ (Рис. 9, г).

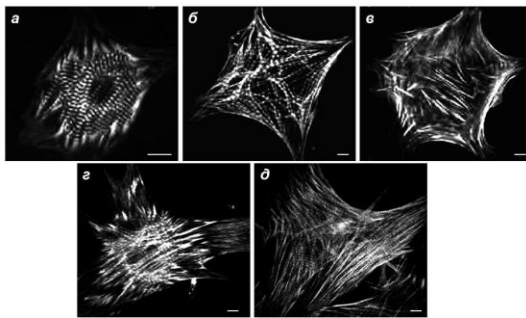


Рис. 9. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования на матриксе, наработанном такими же кардиомиоцитами. Представлены фотографии КМЦ на разных сроках культивирования на матриксе, наработанном такими же КМЦ. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в отсутствие белков ВКМ. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. а – Стадия 1; б – Стадия 3; в – Стадия 4; г – Стадия 5; д – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Поскольку при культивировании КМЦ на матриксе, наработанном такими же КМЦ, сокращался период перестройки их сократительного аппарата, но не наблюдалось непрерывного поддержания его исходной организации, мы предположили, что матрикс от сердечных фибробластов может являться более подходящим для поддержания типичной организации сократительного аппарата КМЦ, поскольку фибробласты являются основными продуцентами ВКМ в ткани сердца. В связи с этим КМЦ культивировали на ВКМ, наработанном сердечными фибробластами, и анализировали состояние их сократительной системы на разных сроках культивирования. Наблюдали такое же сокращение

периода перестройки сократительного аппарата КМЦ, как и в случае их культивирования на матриксе от КМЦ.

8. Организация сократительного аппарата КМЦ на разных сроках культивирования в 0,1%-ных коллагеновых гелях. Несмотря на то что подтвердилось предположение о влиянии белков ВКМ на перестройку сократительного аппарата КМЦ, мы не наблюдали непрерывного поддержания миофибриллярной организации при использовании ВКМ от кардиомиоцитов или сердечных фибробластов в качестве подложки для культуры КМЦ. В связи с этим мы предположили, что для КМЦ может быть необходима трехмерная организация матрикса, которая больше соответствует условиям микроокружения в сердечной ткани, где клетки окружены ВКМ со всех сторон. Поскольку основным компонентом ВКМ в нормальном сердце является коллаген I типа, мы решили исследовать динамику сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в трехмерных коллагеновых гелях. При культивировании КМЦ в коллагеновых гелях с концентрацией коллагена 1 мг/мл на всех исследуемых сроках, которые соответствовали Стадиям 1, 3, 4, 5 и 7 перестройки сократительного аппарата КМЦ при их монослойном культивировании, морфология клеток и организация их сократительного аппарата оставалась одинаковой и соответствовала типичному состоянию, характерному для КМЦ в ткани сердца (Рис. 10, а-е). Подавляющее большинство клеток в гелях с указанной концентрацией коллагена имело характерную палочковидную форму без отростков. Миофибриллы с четкой поперечной исчерченностью заполняли фактически весь объем клеток и располагались параллельно друг другу. Упорядоченная организация миофибрилл приводила к совпадению исчерченности у большинства миофибрилл от одного края клетки до другого и формированию общего миофибриллярного пласта (Рис. 10, а-е).

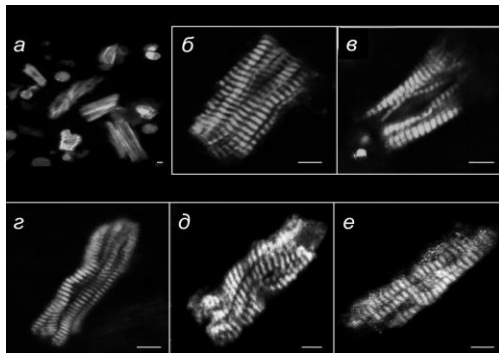


Рис. 10. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования в 0,1%-ных коллагеновых гелях. Представлены фотографии КМЦ на разных сроках культивирования в коллагеновом геле с концентрацией коллагена 1 мг/мл. Сроки соответствуют разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в двумерных условиях. Клетки окрашены родамин-фаллоидином, выявляющим полимерные актиновые структуры. а – общий вид клеток; б – Стадия 1; в – Стадия 3; г – Стадия 4; д – Стадия 5; е – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Непрерывное поддержание миофибриллярного аппарата КМЦ в трехмерных коллагеновых гелях показывает, что наличие подходящего внеклеточного микроокружения предотвращает перестройку их сократительной системы. Кроме того, при анализе ММП в культуре КМЦ в 0,1%-ных коллагеновых гелях была показана крайне низкая секреторная активность клеток (результаты не представлены). Полученные данные подтверждают наше предположение о том, что перестройка сократительного аппарата КМЦ в культуре вызвана отсутствием необходимого ВКМ.

9. Экспрессия изоформ актина в КМЦ в процессе культивирования. Основная изоформа актина в терминально дифференцированных КМЦ представлена сердечным актином (Vandekerckhove et al., 1986). Однако известно, что при помещении КМЦ в условия *in vitro* в клетках может наблюдаться появление гладкомышечного α -актина (van Bilsen and Chien, 1993; Schaub et al., 1997). В связи с этим было необходимо определить изоформы актина в КМЦ на разных сроках перестройки их сократительного аппарата. Экспрессию изоформ актина анализировали с помощью ПЦР с использованием специфичных праймеров к сердечному и гладкомышечному α -актину (α -SMA).

Временные точки, которые использовали в анализе, соответствовали ключевым этапам перестройки сократительного аппарата и включали стадию сохраненного миофибриллярного аппарата (Стадию 1), стадию полного преобразования миофибрилл в стресс-фибриллоподобные структуры (Стадию 4) и стадию восстановления миофибриллярного аппарата (Стадию 7). На Стадии 1 наблюдали высокий уровень экспрессии сердечного α -актина, тогда как гладкомышечный α -актин не выявлялся, что полностью соответствует нормальному паттерну экспрессии изоформ актина в зрелых КМЦ. На Стадии 4 выявлялся высокий уровень экспрессии гладкомышечного α -актина с отсутствием сердечной изоформы. На Стадии 7 сердечный α -актин являлся доминирующей изоформой, при этом гладкомышечная изоформа выявлялась на низком уровне (Рис. 11). Полученные результаты указывают на временное замещение сердечного α -актина гладкомышечной изоформой в процессе культивирования КМЦ.

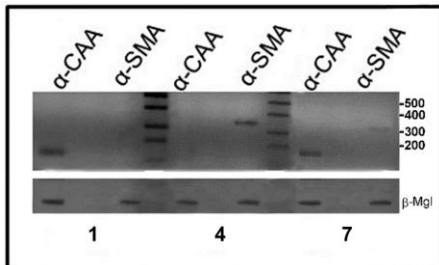


Рис. 11. Экспрессия изоформ актина в кардиомиоцитах на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата.

Представлены результаты ПЦР-анализа с использованием специфичных праймеров к сердечному α -актину (α -CAA) и гладкомышечному α -актину (α -SMA). На Стадии 1 перестройки сократительного аппарата КМЦ наблюдается экспрессия сердечного α -актина с отсутствием гладкомышечной изоформы. На Стадии 4 выявляется экспрессия только гладкомышечного α -актина. На Стадии 7 наблюдается доминирующая экспрессия сердечного α -актина, при этом гладкомышечная изоформа выявляется на низком уровне. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса (п.о.). Для контроля нагрузки определяли экспрессию β -миоглобина (β -Mgl).

10. Синтез гладкомышечного α -актина и его локализация в сократительных структурах КМЦ в процессе культивирования. Для того чтобы подтвердить появление гладкомышечного α -актина в культивируемых КМЦ на белковом уровне, проводили анализ с помощью Вестерн-блоттинга на сроках культивирования, соответствующих разным стадиям перестройки сократительного аппарата КМЦ (Стадии 3, 5 и 7). Количество гладкомышечного α -актина постепенно снижалось от Стадии 3, соответствующей частичной перестройке сократительного аппарата КМЦ, к Стадии 7, соответствующей восстановлению миофибриллярной организации (Рис. 12), при этом на Стадии 7 он выявлялся на очень низком уровне (Рис. 12), что согласуется с данными ПЦР-анализа.

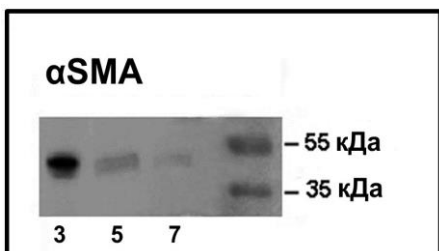


Рис. 12. Продукция гладкомышечного α -актина в кардиомиоцитах на разных стадиях перестройки их сократительного аппарата. Анализ с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против гладкомышечного α -актина (α -SMA) выявил продукцию гладкомышечной изоформы актина (42 кДа) в КМЦ на Стадиях 3, 5 и 7 перестройки их сократительного аппарата с постепенным снижением количества белка от Стадии 3 к Стадии 7. Числовые значения соответствуют положению маркеров молекулярного веса (кДа).

Для оценки включения гладкомышечного α -актина в сократительные структуры КМЦ на разных сроках культивирования окрашивали с помощью антител против гладкомышечной изоформы α -актина и сравнивали полученные данные с результатами окраски клеток родамин-фаллоидином, который окрашивает все полимерные актиновые структуры, включающие разные изоформы. На

Стадии 1 перестройки сократительной системы, когда КМЦ еще сохраняли миофибриллярный аппарат и активно сокращались, выявлялись только следы гладкомышечного α -актина в околядерной области (Рис. 13, а). Однако уже на Стадии 2, когда миофибриллы еще сохранялись в клетках, гладкомышечный α -актин выявлялся во всех актинсодержащих структурах, как миофибриллярных, так и стресс-фибриллоподобных (Рис. 13, б). На Стадии 4 гладкомышечный α -актин выявлялся во всех стресс-фибриллоподобных структурах, которые занимали весь объем клеток (Рис. 13, в). На Стадии 6 гладкомышечный α -актин выявлялся в стресс-фибриллоподобных структурах на периферии клеток, а также в некоторых фрагментах заново образующихся миофибрилл в центральной части клеток. При этом основная масса миофибрилл не окрашивалась антителами против гладкомышечной изоформы актина (Рис. 13, г). На Стадии 7 гладкомышечный α -актин выявлялся только в стресс-фибриллоподобных структурах в отростках клеток (Рис. 13, д). Таким образом, в процессе восстановления миофибриллярного аппарата КМЦ гладкомышечный α -актин покидал область заново образующихся миофибрилл.

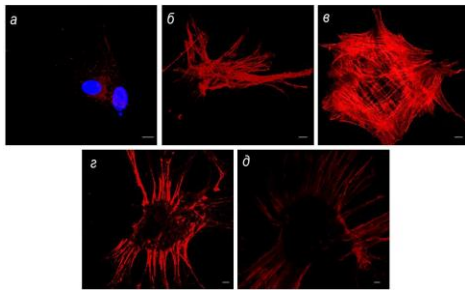


Рисунок 13. Гладкомышечный α -актин в структурах сократительного аппарата кардиомиоцитов. Представлены фотографии КМЦ, окрашенных антителами против гладкомышечной изоформы актина на разных стадиях перестройки сократительного аппарата. а – Стадия 1, ядра окрашены DAPI для выявления положения клеток; б – Стадия 2; в – Стадия 4; г – Стадия 6; д – Стадия 7. Масштабные отрезки – 10 мкм.

Результаты Вестерн-блоттинга, ПЦР-анализа, а также иммунофлуоресцентного анализа показывают, что перестройка сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования сопровождается сменой изоформ актина с временной экспрессией гладкомышечного α -актина, который в норме характерен для гладкомышечных клеток и миофибробластов, а также экспрессируется в КМЦ в ходе эмбрионального развития (Vandekerckhove, et al., 1986; Ruzicka and Schwartz, 1988; van Bilsen and Chien, 1993). Известно, что гладкомышечный α -актин может появляться в различных клетках при патологических изменениях, а также в результате реакции на стресс (Wang et al., 2006; Tomasek et al., 2002). В связи с этим мы считаем, что в нашей модели его появление на ранних сроках культивирования может являться ответом клеток на непривычные для них условия культивирования и отсутствие ВКМ. Анализ с помощью Вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентного окрашивания показал, что появление гладкомышечного α -актина предшествует превращению миофибрилл в структуры немышечного типа. Кроме того, его появление соответствует прекращению сократительной активности клеток, несмотря на сохранение миофибрилл, которые интенсивно окрашиваются антителами против гладкомышечного актина наряду с неисчерченными структурами. На сегодняшний день накопилось достаточно много данных, указывающих на то, что разные изоформы актина, несмотря на консервативные последовательности, не могут замещать друг друга без изменения функции (Kumar et al. 1997; Khaitlina, 2001). В частности, гладкомышечная и скелетная изоформы актина не могут обеспечить нормальное формирование миофибриллярного аппарата в моделях нокаута сердечной изоформы (Kumar et al., 1997). В свете этих данных мы считаем, что именно включение гладкомышечного α -актина в миофибриллярные структуры на раннем сроке культивирования является причиной прекращения сократительной активности КМЦ и приводит к преобразованию миофибрилл в структуры, напоминающие стресс-фибриллы немышечных клеток. Таким образом, мы считаем, что перестройка сократительного аппарата КМЦ обусловлена

замещением сердечного актина гладкомышечной изоформой. Восстановление миофибриллярного аппарата сопровождается снижением гладкомышечной изоформы, при этом по результатам иммунофлуоресцентного окрашивания гладкомышечный актин покидает область, которую занимают заново образующиеся миофибриллы. Такие данные указывают на то, что миофибриллярные структуры формируются на основе сердечной изоформы актина – по результатам ПЦР сердечный актин экспрессируется на высоком уровне в КМЦ с восстановленной сократительной системой.

Процесс восстановления исходной организации сократительного аппарата КМЦ во многом напоминает стадии эмбрионального развития сердца, в ходе которых происходит формирование новых миофибрилл. Показано, что в раннем кардиогенезе также наблюдается временная экспрессия гладкомышечного актина (Ruzicka and Schwartz 1988), который в процессе развития замещается на скелетную и сердечную изоформу α -актина. В дифференцированных КМЦ основной изоформой является сердечный актин с полным отсутствием экспрессии гладкомышечного актина (Vandekerckhove et al., 1986; Ruzicka and Schwartz, 1988; van Bilsen and Chien, 1993). Однако в случае нашей модели экспрессия гладкомышечной изоформы не полностью подавляется в КМЦ с восстановленной сократительной системой, а сохраняется на низком уровне наряду с сердечной изоформой. Мы объясняем это наличием гладкомышечного актина в отростках клеток, где его распределение, вероятно, соответствует области фокальных контактов – структур, обеспечивающих прикрепление клеток к подложке. Показано, что строение фокальных контактов существенно отличается от строения контактов, с помощью которых КМЦ в ткани соединяются с соседними клетками и ВКМ, и требует несаркомерной организации актиновых микрофиламентов, участвующих в их формировании (Atherton et al., 1986). Эти данные могут объяснять сохранение в отростках КМЦ стресс-фибриллоподобных структур, содержащих гладкомышечную изоформу актина.

11. Обратная корреляция между продукцией белков ВКМ и гладкомышечного актина кардиомиоцитами. Полученные результаты особенно интересны при их совместном рассмотрении с нашими данными о том, что восстановление миофибриллярной организации сократительного аппарата КМЦ происходит по мере накопления белков ВКМ. Поскольку в ходе кардиогенеза также наблюдаются изменения ВКМ (Nakagawa et al., 1992), наши результаты могут указывать на роль ВКМ в формировании миофибрилл как в процессе культивирования КМЦ, так и в ходе их эмбрионального развития.

При сопоставлении данных Вестерн-блоттинга для внеклеточных белков и гладкомышечного актина было обнаружено, что накопление белков ВКМ сопровождается постепенным снижением количества гладкомышечной изоформы актина в КМЦ. Таким образом, была выявлена обратная корреляция между продукцией ВКМ и гладкомышечного α -актина кардиомиоцитами (Рис. 14). При этом восстановлению исходной организации сократительного аппарата КМЦ предшествует максимальное накопление ВКМ и снижение гладкомышечной изоформы актина.

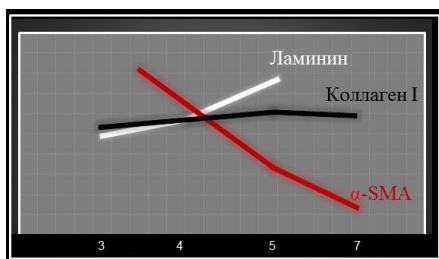


Рис. 14. Обратная корреляция между продукцией белков внеклеточного матрикса и гладкомышечного актина кардиомиоцитами. Представлен график зависимости количества гладкомышечного α -актина (α -SMA) в КМЦ и внеклеточных белков ламинина и коллагена от стадии перестройки сократительного аппарата. График построен на основе значений, рассчитанных с помощью программы Quantity One. Показана корреляция между снижением гладкомышечного актина, с одной стороны, и накоплением коллагена и ламинина, с другой.

Такие данные могут указывать на взаимную регуляцию между белками ВКМ и гладкомышечным актином в процессе культивирования КМЦ. Известно, что взаимодействие клеток с компонентами ВКМ опосредуется трансмембранными белками – интегринами (Borg et al., 1996), которые взаимодействуют с компонентами ВКМ через внеклеточный домен и с сократительными структурами клеток с помощью внутриклеточного домена. Показано, что интегрин может передавать сигналы из внеклеточного пространства в клетки посредством механотрансдукции (Israeli-Rosenberg et al., 2014) – процесса, с помощью которого клетки превращают механические усилия (в частности, натяжение ВКМ) в биохимические сигналы (Ko and McCulloch, 2001). С другой стороны, на сегодняшний день накопилось много данных о роли актина в регуляции экспрессии генов (Viita and Vartiainen, 2016). В частности, показано, что динамика цитоплазматического актина может влиять на активность транскрипционных факторов и, таким образом, модулировать экспрессию различных генов (Haller et al., 2004; Favot et al., 2005). В свете описанных данных показанная нами обратная корреляция между гладкомышечным α -актином и белками ВКМ позволяет говорить о механизмах регуляции динамики сократительного аппарата КМЦ в культуре через петлю отрицательной обратной связи, где гладкомышечный α -актин модулирует синтез ВКМ, который в свою очередь подавляет гладкомышечную изоформу актина посредством интегрин-опосредованной механотрансдукции и стимулирует экспрессию сердечного актина.

ВЫВОДЫ

1. Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре определяется присутствием и пространственной организацией внеклеточного матрикса.
2. Перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов с преобразованием миофибрилл в структуры немышечного типа вызвана отсутствием внеклеточного матрикса и обусловлена экспрессией гладкомышечной изоформы α -актина, которая несовместима с саркомерными белками и миофибриллярной организацией сократительного аппарата.
3. Изменение организации сократительного аппарата кардиомиоцитов позволяет клеткам сменить сократительную функцию на синтетическую для продукции и ремоделирования необходимых компонентов внеклеточного матрикса.
4. Нарботка оптимального внеклеточного матрикса кардиомиоцитами обеспечивает восстановление исходной организации их сократительного аппарата и сократительной функции.
5. Существует петля отрицательной обратной связи между гладкомышечным α -актином и внеклеточным матриксом, в которой гладкомышечная изоформа α -актина модулирует синтез ВКМ, что в свою очередь подавляет экспрессию гладкомышечного α -актина и индуцирует экспрессию сердечного α -актина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Bildyug N.** (2016) Matrix metalloproteinases: an emerging role in regulation of actin microfilament system. *Biomol Concepts*. 2016-0022/bmc-2016-0022.xml. doi: 10.1515/bmc-2016-0022. [Epub ahead of print].
2. **Bildyug N.**, Bozhokina E., Khaitlina S. (2016) Contribution of α -smooth muscle actin and extracellular matrix to the in vitro reorganization of cardiomyocyte contractile system. *Cell Biol Int*, 40(4): 472–477.
3. **Бильдюг Н.Б.**, Воронкина И.В., Смагина Л.В., Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2015) Матриксные металлопротеиназы в первичной культуре КМЦ. *Биохимия*, 80(10): 1595–1604.
4. **Бильдюг Н.Б.**, Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2014) Организация сократительного аппарата КМЦ при их культивировании в коллагеновых гелях. *Цитология*, 56(11): 822–827.
5. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. (2013) Зависимость организации сократительного аппарата КМЦ от ВКМ. *Цитология*, 55(10): 713–724.

Статьи в других рецензируемых изданиях:

1. **Бильдюг Н.Б.** (2016) Проблема получения КМЦ с помощью методов дифференцировки (Обзор). *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 32: 82–95.
2. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. (2013) Влияние ингибитора пролиферации цитозин-арабинозида на организацию сократительного аппарата КМЦ. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*. 29: 36–42.

Тезисы:

1. **Bildyug N.B.** 2016. Plasticity of contractile system in cultivated rat neonatal cardiomyocytes and its regulation by extracellular matrix. *International Symposium Biological Motility*. Pushchino, Russia. May 12–15, Materials of symposium, pp. 30–31.
2. **Бильдюг Н.Б.**, Божокина Е.С., Хайтлина С.Ю. 2015. Корреляция накопления белков ВКМ со сменой изоформ актина в культуре КМЦ. II Всероссийская конференция «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет». Санкт-Петербург, 20–22 октября. Тезисы докладов и сообщений. *Цитология* 57(9): 619.
3. **Bildyug N.**, Bozhokina E., Khaitlina S. 2015. Reorganization of the contractile system in rat neonatal cardiomyocytes is regulated by extracellular matrix. *J Muscle Res Cell Motil. European Muscle Conference 2015 Abstracts*, 36:577.
4. **Бильдюг Н.Б.**, Юдинцева Н.М. 2014. Влияние трехмерных условий культивирования на организацию сократительного аппарата КМЦ. 18-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино, 21–25 апреля. Сборник тезисов, с.11.
5. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. 2013. Зависимость изменений в организации сократительного аппарата культивируемых КМЦ от секретируемых ими белков ВКМ. Всероссийский симпозиум и школа-конференция для молодых ученых «Биология клетки в культуре». Санкт-Петербург, 21–25 октября. Тезисы докладов и сообщений. *Цитология*, 55(9): 630–631.
6. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г. П. 2012. Влияние белков ВКМ на сократительный аппарат КМЦ. III Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. Санкт-Петербург, 15–16 мая 2012. Тезисы докладов и сообщений. *Цитология*, 54(4): 336.
7. **Бильдюг Н.Б.**, Пинаев Г.П. 2008. Реорганизация сократительного аппарата КМЦ в процессе их культивирования. 12-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». 10–14 ноября, Пущино. Сборник тезисов, с. 73–74.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Арз 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. — Борисов А.Б., Гончарова Е.И., Пинаев Г.П., Румянцев П.П. (1989) Изменения локализации α -актина и миофибриллогенез в кардиомиоцитах крыс при культивировании. *Цитология*, 31(6): 642–646. — Петухова О.А., Туроверова Л.В., Кропачева 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., Behnke M.M. (1988) Structure of myofibrils at extra-junctional membrane attachment sites in cultured cardiac muscle cells. *J Cell Sci*, 89: 97–106. — Barallobre-Barreiro J., Didangelos A., Schoendube F.A., Drozdov I., Yin X., Fernández-Caggiano M., Willeit P., Puntmann V.O., Aldama-López G., Shah A.M., Doménech N., Mayr M. (2012) Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 125: 789–802. — Borg, T.K., Rubin K., Carver W., Samarel A.M., and Terracio L. 1996. The cell biology of the cardiac interstitium, *Trends Cardiovasc. Med.*, 6, 65–70. — Camelliti P., Borg T.K., Kohl P. (2005) Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 65: 40–51. — 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. — Chapman R.E., Scott A.A., Deschamps A.M., Lowry A.S., Stroud R.E., Ikonomidis J.S., Spinale F.G. (2003) Matrix metalloproteinase abundance in human myocardial fibroblasts: effects of sustained pharmacologic matrix metalloproteinase inhibition, *J Mol Cell Cardiol*, 35: 539–548. — Dickson S.R., Warburton M.J. (1992) Enhanced synthesis of gelatinase and stromelysin by myoepithelial cells during involution of the rat mammary gland. *J Histochem Cytochem*, 40: 697–703. — Erokhina I.L., Rummyantsev P.P. (1986) Ultrastructure of DNA-synthesizing and mitotically dividing myocytes in sinoatrial node of mouse embryonal heart. *J Mol Cell Cardiol*, 18: 1219–1231. — Favot L., Hall S.M., Haworth S.G., Kemp P.R. (2005) Cytoplasmic YY1 is associated with increased smooth muscle-specific gene expression: implications for neonatal pulmonary hypertension. *Am J Pathol*, 167: 1497–1509. — Grinnell F. (1978) Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int Rev Cytol*, 53: 65–144. — Haller K., Rambaldi I., Daniels E., Featherstone M. (2004) Subcellular localization of multiple PREP2 isoforms is regulated by actin, tubulin, and nuclear export. *J Biol Chem*, 279: 49384–49394. — Herron G., Werb Z., Dwyer K., Banda M. (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 261: 2810–2813. — Hsieh H.L., Lin C.C., Shih R.H., Hsiao L.D., Yang C.M. (2012) NADPH oxidase-mediated redox signal contributes to lipoteichoic acid-induced MMP-9 upregulation in brain astrocytes. *J Neuroinflammation*, 9: 110. — Israeli-Rosenberg S., Manso A.M., Okada H., Ross R.S. (2014) Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res*, 114(3): 572–586. — Khaitlina S.Y. (2001) Functional specificity of actin isoforms. *Int Rev Cytol*, 202: 35–98. — Ko K.S., McCulloch C.A. (2001) Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochem Biophys Res Commun*, 285: 1077–1083. — Koivukangas V., Kallioinen M., Autio-Harmainen H., Oikarinen A. (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol*, 74: 279–282. — Kumar A., Crawford K., Close L., Madison M., Lorenz J., Doetschman T., Pawlowski S., Duffy J., Neumann J., Robbins J., Boivin G.P., O'Toole B.A., Lessard J.L. (1997) Rescue of cardiac α -actin-deficient mice by enteric smooth muscle-actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 4406–4411. — Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685. — Mishra P.K., Metreveli N., Tyagi S.C. (2010) MMP-9 gene ablation and TIMP-4 mitigate PAR-1-mediated cardiomyocyte dysfunction: a plausible role of dicer and miRNA. *Cell Biochem Biophys*, 57: 67–76. — Nag A.C., Cheng M. (1981) Adult mammalian cardiac muscle cells in culture. *Tissue Cell*, 13: 515–523. — Nakagawa M., Terracio L., Carver W., Birkedal-Hanse H., Borg T.K. (1992) Expression of collagenase and IL-1 α in developing rat hearts. *Dev dyn*, 195: 87–99. — Naqvi N., Li M., Calvert J.W., Tejada T., Lambert J.P., Wu J., Kesteven S.H., Holman S.R., Matsuda T., Lovelock J.D., Howard W.W., Iismaa S.E., Chan A.Y., Crawford B.H., Wagner M.B., Martin D.I., Lefer D.J., Graham R.M., Husain A. (2014) A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell*, 157(4): 795–807. — Romanic A.M., Harrison S.M., Bao W., Burns-Kurtis C.L., Pickering S., Gu J., Grau E., Mao J., Sathe G.M., Ohlstein E.H., Yue T.L. (2002) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted deletion of matrix metalloproteinase-9. *Cardiovasc Res*, 54: 549–558. — Ruzicka D.L., Schwartz R.J. (1988). Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol*, 107: 2575–2586. — Schaub M.C., Hefti M.A., Harder B.A., Eppenberger H.M. (1997). Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med*, 75: 901–920. — Spinale F., Mukherjee R., Fulbright B., Hu J., Crawford F., Zile M. (1993) Contractile properties of isolated porcine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 27: 304–311. — Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A. (2002) Myofibroblasts and mechanoregulation of

connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 349–363. — *van Bilsen M., Chien K.R.* (1993). Growth and hypertrophy of the heart: Toward an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc Res*, 27: 1140–1149. — *Vandekerckhove J., Bugaisky G., Buckingham M.* (1986) Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. *J Biol Chem*, 261: 1838–1843. — *Viita T., Vartiainen M.K.* (2016) From Cytoskeleton to Gene Expression: Actin in the Nucleus. *Handb Exp Pharmacol* 2016; Jun 18 [Epub ahead of print]. — *Wang J., Zohar R., McCulloch C.A.* (2006). Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 312: 205–214. — *Werb Z., Alexander C.* (1993) Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of Rheumatology*, edited by W. N. Kelly. New York: Saunders: 248–268. — *Woessner J.* (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*, 5: 2145–2154.