

УДК 576.5

МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ КАРДИОМИОЦИТОВ

© 2015 Н.Б. Бильдюг*, И.В. Воронкина,
Л.В. Смагина, Н.М. Юдинцева, **Г.П. Пинаев**

*Институт цитологии РАН, Тихорецкий пр., 4, 194064 Санкт-Петербург;
факс: +7(812)297-0341, электронная почта: relapse@yandex.ru*

Поступила в редакцию 06.03.15
После доработки 25.04.15

Кардиомиоциты в составе сердечной ткани имеют высокоорганизованный сократительный аппарат, который позволяет им непрерывно поддерживать сократительную способность, в то время как за синтез и пространственную организацию компонентов внеклеточного матрикса отвечают в основном фибробласты и клетки эндотелия. Однако при переводе кардиомиоцитов в двумерные системы культивирования происходит обратимая перестройка их сократительного аппарата, которая сопровождается временной утратой сократительной способности и началом синтеза компонентов внеклеточного матрикса. В настоящей работе проведено исследование матриксных металлопротеиназ на разных сроках культивирования кардиомиоцитов в двумерных условиях и трехмерных коллагеновых гелях. Показано, что кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования секретируют матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9, причем уровень указанных ММП меняется в зависимости от срока культивирования. Максимальный уровень ММП-9 наблюдается на ранних сроках культивирования, которые соответствуют перестройке сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре, а максимальное накопление ММП-2 предшествует восстановлению исходной организации их сократительного аппарата. При культивировании кардиомиоцитов в трехмерной системе на основе коллагена, в которой не происходит перестроек их сократительного аппарата, ММП-2 и ММП-9 секретируются на незначительном уровне с отсутствием выраженной динамики. Эти данные указывают на то, что перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования связаны с необходимостью синтеза собственного внеклеточного матрикса и его пространственной организации самими кардиомиоцитами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кардиомиоциты, матриксные металлопротеиназы, коллагеновые гели.

Подавляющее большинство клеток в организме находится в непосредственном контакте с внеклеточным матриксом. Внеклеточный матрикс образует упорядоченную пространственную сеть, на поверхности и внутри которой клетки могут перемещаться и взаимодействовать друг с другом. Внеклеточный матрикс синтезируется и секретируется специализированными клетками и в различных тканях имеет разный состав и пространственную организацию. В мышечной ткани сердца основные компоненты внеклеточного матрикса синтезируются сердечными фибробластами, эндотелиоцитами и перикардиоцитами, в то время как кардиомиоциты специализируются на функции сокращения. В связи с этим кардиомиоциты имеют высокоорганизованный сократительный аппарат, образованный миофибриллами.

Принятые сокращения: ММП – матриксная металлопротеиназа.

* Адресат для корреспонденции.

Известно, что кардиомиоциты можно поддерживать в первичной культуре в течение длительного времени. Однако в процессе культивирования они теряют свою исходную организацию. При этом наблюдается перестройка их сократительного аппарата с обратимым преобразованием типичных миофибриллярных структур в неисчерченные структуры, напоминающие стресс-фибриллы немускульных клеток [1–7], что сопровождается утратой способности к сокращению. На сегодняшний день причины и механизмы таких перестроек неизвестны.

Ранее нами были подробно описаны обратимые перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования [7]. Реорганизация начинается на 5–6-е сут культивирования и приводит к полному исчезновению исчерченных структур к 8–10-м сут культивирования. Восстановление исходной организации сократительного аппарата начинается на 15–17-е сут культивирования с фактически полным восстановлением к 20–22-м сут.

Описанные изменения сопровождаются синтезом компонентов внеклеточного матрикса самими кардиомиоцитами [8]. Поскольку в сердечной ткани таких перестроек не наблюдается, мы предположили, что они связаны с потерей кардиомиоцитами их естественного микроокружения при переводе в культуру, при этом восстановление исходной организации происходит после наработки необходимого внеклеточного окружения самими кардиомиоцитами. Однако при культивировании кардиомиоцитов на двумерных подложках, содержащих наработанные такими же кардиомиоцитами компоненты внеклеточного матрикса, не наблюдается непрерывного поддержания исходной организации их сократительного аппарата [8]. С другой стороны, при культивировании кардиомиоцитов в трехмерных коллагеновых гелях не происходит реорганизации их сократительного аппарата [9]. По-видимому, помимо состава синтезированного внеклеточного матрикса для кардиомиоцитов может быть существенна его пространственная организация.

Известно, что в ткани за пространственную организацию внеклеточного матрикса отвечают матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП представляют собой семейство цинк- и кальций-зависимых эндопептидаз, которые расщепляют компоненты внеклеточного матрикса, в основном коллагены, и играют важную роль во многих нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, морфогенез, репродукция и ремоделирование ткани, а также в различных патологических процессах [10–15]. По специфичности ММП делят на коллагеназы (ММП-1, -8 и -13), желатиназы (ММП-2 и -9) и стромелизины (ММП-3 и -10).

В литературе имеется много данных, описывающих продукцию ММП в сердце немышечными клетками, такими как фибробласты и клетки эндотелия [13, 16–20]. Поскольку в чистой культуре кардиомиоцитов отсутствуют другие клетки, мы предположили, что кардиомиоциты могут сами синтезировать ММП для ремоделирования наработанного ими внеклеточного матрикса. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы проверить это предположение.

На сегодняшний день имеется крайне мало данных о способности самих кардиомиоцитов синтезировать ММП. Тем не менее в одной из работ был показан синтез ММП, в частности желатиназ, кардиомиоцитами взрослых свиней через сутки после их помещения в культуру [21]. Однако в литературе отсутствуют данные о синтезе ММП в процессе длительного культивирования кардиомиоцитов. С другой стороны, известно, что в ходе дифференцировки прогени-

торных клеток в кардиомиоциты наблюдается повышение экспрессии ММП-9 и ММП-2 [22]. На основании этих данных мы предположили, что желатиназы могут быть наиболее ожидаемыми ММП для кардиомиоцитов в культуре.

Таким образом, задачей настоящей работы было исследовать ММП-2 и ММП-9 на разных сроках монослойного и трехмерного культивирования кардиомиоцитов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение первичной культуры кардиомиоцитов. Работу проводили на беспородных лабораторных крысах. Клетки миокарда выделяли из желудочков сердец новорожденных 3–6-суточных животных. Животных усыпляли эфиром, вскрывали грудную клетку, извлекали сердца, отсекали сосудистые пучки, сердца промывали изотоническим фосфатным буфером (PBS, pH 7,4: 140 mM NaCl, 50 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄). 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°. Затем раствор трипсина с небольшим содержанием клеток (в основном поврежденных) удаляли и к оставшимся кусочкам ткани добавляли раствор протеолитических ферментов, содержащий коллагеназу I типа (коллагеназа краба, «Биолот», Россия; 0,5 мг/мл) и трипсин («Sigma», США; 1 мг/мл). Ткань инкубировали в растворе протеолитических ферментов 2 раза по 30 мин при 37°. Клетки в суспензии отмывали от ферментов путем добавления питательной среды DMEM («Биолот», Россия), содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров («Gibco», США) и гентамицин («Биолот», Россия, 50 мкг/мл), и центрифугирования 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 кардиомиоцитов, суспензию клеток наносили на чашки Петри и оставляли в инкубаторе на 2 ч (время, достаточное для адгезии большинства фибробластов). Затем неприкрепившиеся кардиомиоциты переносили на другие чашки Петри (или на покровные стекла) в концентрации $\sim 6 \times 10^4$ клеток/см². Таким образом получали культуру, обогащенную кардиомиоцитами. Для избавления от оставшихся делящихся фибробластов на 2-е сут культивирования и далее при каждой второй смене среды в культуру добавля-

ли ингибитор синтеза ДНК цитозин-арабинозид в концентрации 3 мкг/мл. Клетки культивировали в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO₂ при 37°. Смену среды производили каждые 2–3 сут. За состоянием культивируемых клеток наблюдали с помощью инвертированного микроскопа («ЛОМО», Россия). Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием раствором трипанового синего. На всех сроках культивирования во всех исследуемых культурах жизнеспособность клеток составляла 75–80%.

Выявление структур сократительного аппарата в кардиомиоцитах методами непрямой иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии. Клетки на покровных стеклах промывали PBS, фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида на PBS при комнатной температуре в течение 10 мин, затем промывали 3 раза PBS. Обработывали 0,1%-ным раствором тритона X-100 на PBS в течение 3 мин при комнатной температуре, затем промывали 5–6 раз PBS. Для выявления сократительных структур клетки обрабатывали родамин-фаллоидином («Sigma», США) в разведении 1 : 30 (на PBS) в течение 15 мин (в темноте, при комнатной температуре), затем промывали 3 раза PBS. Для стабилизации флуоресцентной метки клетки заключали в специальную среду Mounting Medium («Pharmacia Biotech», Швеция). Препараты хранили при 4° в защищенном от света месте. Готовые препараты анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LEICA TCS SL («Leica», Германия) при 40× увеличении объектива. Для возбуждения флуоресценции использовали HeNe-лазер с длиной волны 543 нм. Оптические срезы обрабатывали с помощью программы Leica Confocal Software («Leica», Германия).

Культивирование кардиомиоцитов в коллагеновых гелях. Для приготовления коллагеновых гелей с концентрацией белка 1 мг/мл использовали коллаген I типа, полученный по стандартной методике [23], стерильный 0,34 М раствор NaOH (для доведения pH до 7,0) и концентрированную (10×) питательную среду 199 («Sigma-Aldrich», США). В полученную смесь добавляли суспензию кардиомиоцитов в питательной среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров и гентамицин. Полученную смесь наносили на покровные стекла (по 100 мкл на стекло) и в стерильных чашках Петри помещали в инкубатор для формирования коллагенового геля. Конечная концентрация клеток составляла 3×10^5 клеток на стекло. После полимеризации гелей в чашки добавляли среду DMEM с сывороткой и гентамицином, клетки культивировали в течение трех недель. Смену среды проводили каждые 2–3 сут. На 2-е сут культивиро-

вания и далее при каждой второй смене среды в культуру добавляли ингибитор синтеза ДНК цитозин-арабинозид в концентрации 3 мкг/мл. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью окраски раствором трипанового синего. На всех сроках культивирования во всех исследуемых культурах жизнеспособность клеток составляла 75–80%.

Зимография. Для определения ММП использовали метод зимографии с желатином [24] в модификации Воронкиной с соавт. [25]. Источником ММП служила среда, кондиционированная кардиомиоцитами в течение двух сут [26]. Кондиционированную среду отбирали на разных сроках культивирования кардиомиоцитов и выдерживали в течение 30 мин в буфере для проб, содержащем 62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8 и 0,1%-ный Ds-Na, и анализировали при помощи Ds-Na-ПААГ-электрофореза в присутствии 0,5 мг/мл желатина в разделяющем геле. Пробы наносили в количестве, соответствующем 10 мкг белка на дорожку. Количество белка в пробе определяли по методу Брэдфорд [27]. По окончании электрофореза гель дважды отмывали 2,5%-ным раствором тритона-X100 для удаления Ds-Na и инкубировали в буфере, содержащем 5 мМ CaCl₂ и 50 мМ Tris-HCl, pH 7,2–7,4, 18 ч при 37° для ренатурации протеаз и протекания протеолитических реакций. После инкубации гель фиксировали в растворе, содержащем 25% изопропанола и 10% уксусной кислоты, в течение 30 мин и окрашивали Кумасси ярко-голубым G 250. Для выявления положения зон, соответствующих ММП-2 и ММП-9, использовали среду, кондиционированную фибробластами линии HT-1080 [24]. Для проведения количественного анализа гели сканировали, полученные изображения обрабатывали с помощью программы Quantity One. Результаты денситометрии представляли в виде графиков.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Данные представляли как среднее \pm SD. Различия считали достоверными при $P < 0,05$ (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования. Ранее нами были подробно описаны перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре. Мы показали, что каждой стадии перестроек соответствует временной диапазон [7, 8]. Поскольку каждая культура индивидуальна, в настоящей работе проводили анализ состоя-

ния сократительного аппарата кардиомиоцитов на разных сроках культивирования для определения временных точек, соответствующих изменениям организации сократительного аппарата. На 3-е сут культивирования наблюдали типичную организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов, представленную поперечно-исчерченными миофибриллами (рис. 1, *а*). Клетки на этом сроке спонтанно сокращались. На 5-е сут культивирования сохранялись только фрагменты миофибрилл, непосредственно переходящие в неисчерченные актинсодержащие структуры, напоминающие стресс-фибриллы немышечных клеток (рис. 1, *б*). На 8 и 10-е сут культивирования наблюдались максимальные изменения сократительного аппарата кардиомиоцитов с полным исчезновением исчерченных миофибрилл. При этом все тело клеток было заполнено стресс-фибриллоподобными структурами (рис. 1, *в*, *г*). Клетки на этих сроках утрачивали способность к сокращению. К 14-м сут культивирования сократительный аппарат кар-

диомиоцитов все еще находился в перестроенном состоянии, однако наблюдалось появление бусинообразных структур, которые предшествуют формированию фрагментов миофибрилл (рис. 1, *д*). На 22-е сут культивирования наблюдали полное восстановление миофибриллярной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов с восстановлением их сократительной способности (рис. 1, *е*). Во всех экспериментах, проведенных для каждой из трех исследуемых культур, наблюдалась аналогичная динамика перестроек сократительного аппарата. Сроки, соответствующие изменениям организации сократительного аппарата, находятся в пределах диапазонов, описанных ранее. Таким образом, полученные результаты полностью соответствуют ранее полученным данным.

ММП на разных сроках монослойного культивирования кардиомиоцитов. Анализ ММП в монослойной культуре кардиомиоцитов проводили на сроках, которые соответствовали разным стадиям процесса перестройки их сократитель-

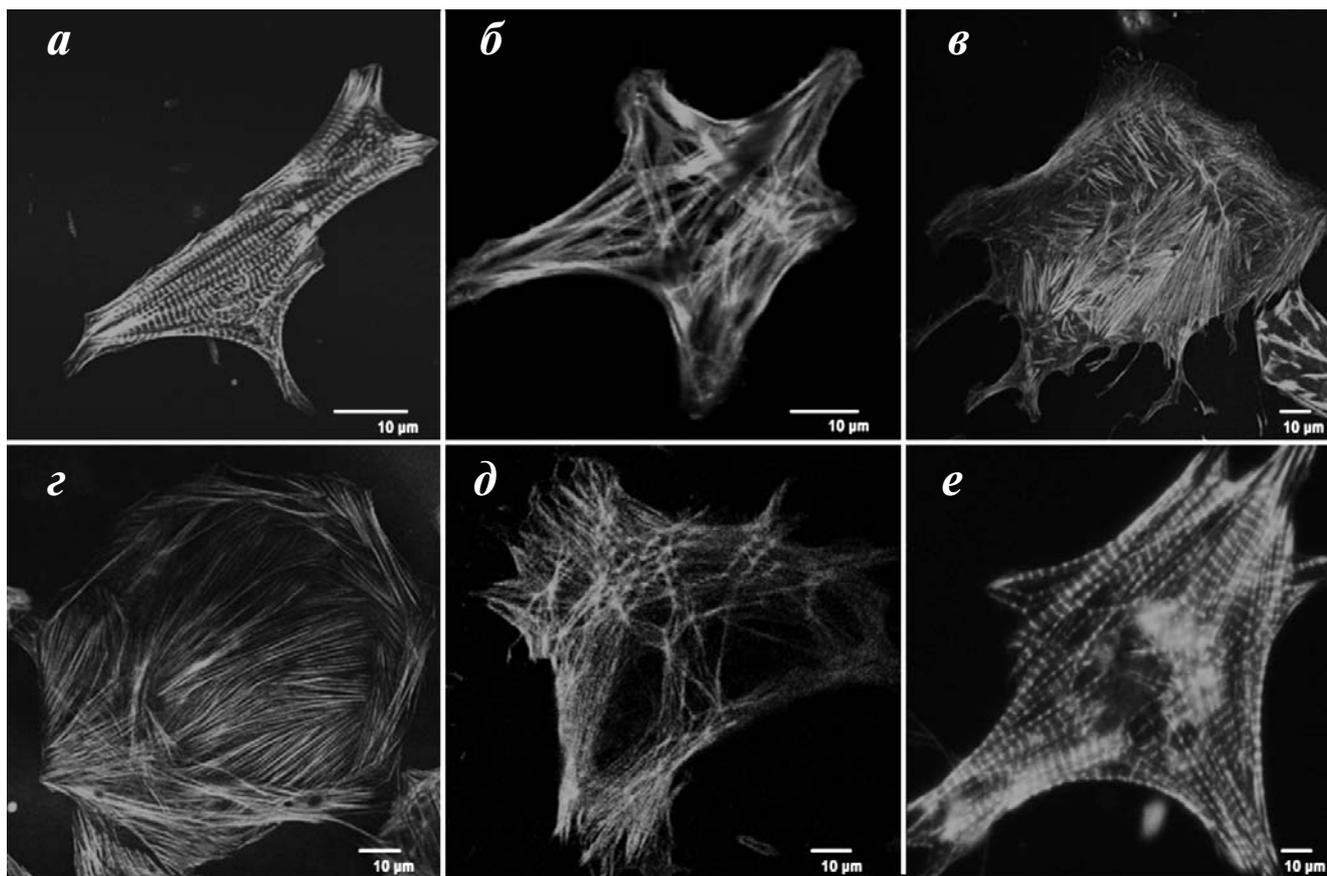


Рис. 1. Кардиомиоциты на разных сроках культивирования: *а* – 3-е, *б* – 5-е, *в* – 8-е, *г* – 10-е, *д* – 14-е, *е* – 22-е сут культивирования. Окраска с помощью родамин-фаллоидина

ного аппарата в ходе длительного культивирования (5, 8, 10, 14 и 22-е сут культивирования). Для определения ММП использовали метод зимографии с желатином, основанный на способности ММП к ренатурации после Ds-Na-ПААГ-электрофореза, приводящей к расщеплению желатина в той зоне геля, в которой находится ММП. На всех исследуемых сроках была обнаружена желатиназная активность в области между 100 и 60 кДа (рис. 2, *a*), что соответствует протеолитической активности ММП-9 и ММП-2 [14, 28]. Область 92 кДа соответствует ММП-9 [14, 28]. Наблюдали повышение желатиназной

активности в этой области от 5 к 8-м и от 8 к 10-м сут культивирования (рис. 2, *b*). Указанные сроки соответствуют реорганизации сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре, которая заключается в исчезновении миофибрилл и появлении структур немышечного типа (рис. 1, *b–e*). На 14-е сут, которые соответствуют начальным стадиям восстановления сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре (рис. 1, *d*), и на 22-е сут культивирования, которые соответствуют полному восстановлению миофибрилярного аппарата кардиомиоцитов в культуре (рис. 1, *e*), наблюдалось снижение же-

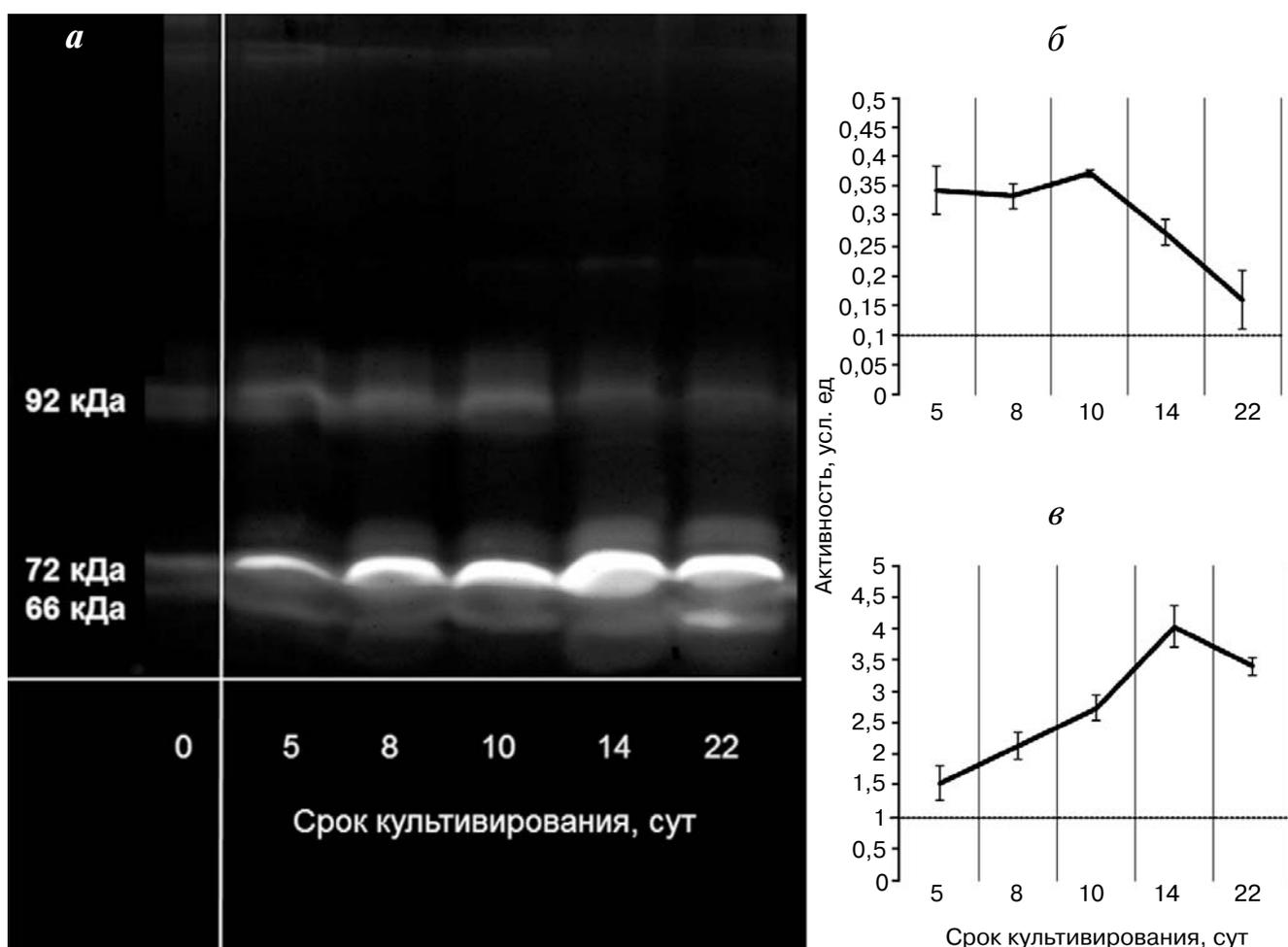


Рис. 2. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 в монослойной культуре кардиомиоцитов. *a* – Зимограмма среды, кондиционированной кардиомиоцитами, на разных сроках монослойного культивирования. Представлены результаты типичного эксперимента. Уровень ММП в контроле (в полной питательной среде для кардиомиоцитов до начала культивирования) соответствует точке 0 на оси X. 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 (по результатам трех экспериментов, данные представлены по отношению к контролю как среднее \pm SD). Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-9. Различия в уровне ММП-9 между 10 и 22-ми сут культивирования достоверно при $P < 0,05$, ANOVA; *в* – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-2 (по результатам трех экспериментов, данные представлены по отношению к контролю как среднее \pm SD). Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-2. Различия в уровне ММП-2 между 5 и 14-ми и 14 и 22-ми сут культивирования достоверны при $P < 0,05$, ANOVA

латиназной активности в этой области (рис. 2, б). 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 [29]. Желатиназная активность ММП-2 на всех исследуемых сроках культивирования значительно превышала контрольный уровень (рис. 2, в). Наблюдалось постепенное повышение активности в данной области от 5 к 8, от 8 к 10 и от 10 к 14-м сут культивирования, которое предшествует восстановлению сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре. К 22-м сут культивирования, соответствующим восстановлению миофибриллярного

аппарата кардиомиоцитов, активность в данной области снижалась (рис. 2, в).

ММП на разных сроках культивирования кардиомиоцитов в коллагеновых гелях. Для сопоставления данных по секреции ММП кардиомиоцитами в двумерных и трехмерных системах культивирования проводили анализ ММП в культуре кардиомиоцитов в коллагеновых гелях. Пробы отбирали на сроках, которые соответствовали разным стадиям процесса перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в ходе их культивирования в двумерных условиях (на 3, 5, 10, 15 и 20-е сут культивирования). Наблюдала желатиназную активность в области между 100 и 60 кДа (рис. 3, а), что соответствует

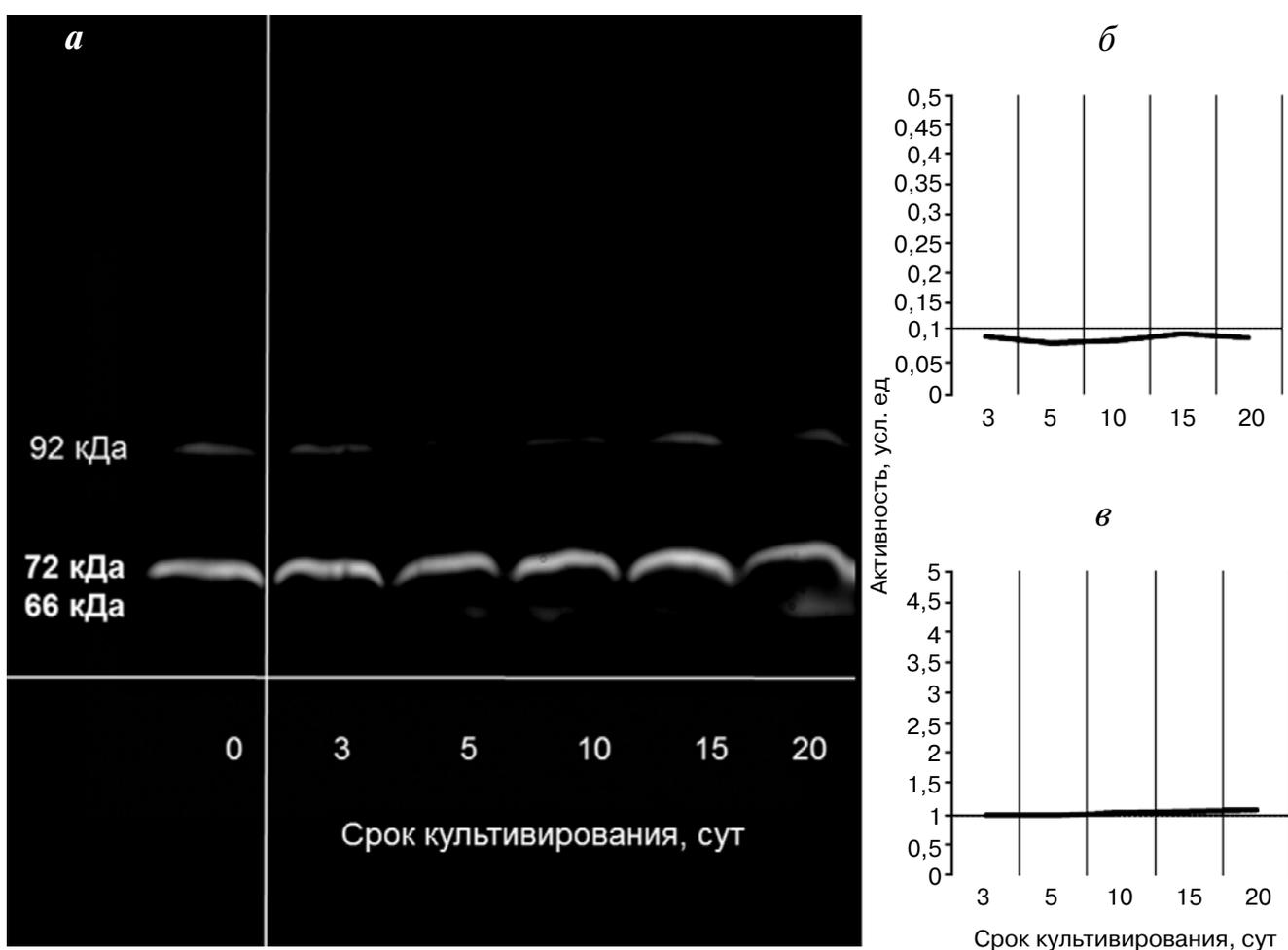


Рис. 3. Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 в культуре кардиомиоцитов в коллагеновом геле. *a* – Зимограмма среды, кондиционированной кардиомиоцитами, на разных сроках культивирования в коллагеновых гелях. Представлены результаты типичного эксперимента. Уровень ММП в контроле (в полной питательной среде для кардиомиоцитов до начала культивирования) соответствует точке 0 на оси X. 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 (по результатам двух экспериментов). Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-9. Значения представлены как среднее; *в* – усредненные результаты денситометрии зимограмм для ММП-2 (по результатам двух экспериментов). Пунктирная линия показывает контрольный уровень ММП-2. Значения представлены как среднее

протеолитической активности MMP-9 и MMP-2 [14, 28]. Было показано, что желатиназная активность в области 92 кДа, которая соответствует активности MMP-9, не превышала контрольный уровень на всех исследуемых сроках культивирования (рис. 3, б), что указывает на отсутствие динамики секреции MMP-9 кардиомиоцитами в коллагеновых гелях. Желатиназная активность в области 60–72 кДа, соответствующая активности MMP-2, незначительно превышала контрольный уровень с 10 по 20-е сут культивирования кардиомиоцитов в коллагеновых гелях (рис. 3, в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

MMP являются важными регуляторами внеклеточного матрикса в сердце и вносят вклад в поддержание его физиологической функции. Изменение экспрессии различных MMP в сердце может наблюдаться в ходе нормального развития [10–15, 30], а также при различных заболеваниях, например, при диабете, острой ишемии и кардиомиопатиях, в моделях гипертрофии и сердечной недостаточности [10, 11, 31–48]. В сердечной ткани ключевую роль в ремоделировании внеклеточного матрикса путем синтеза MMP играют фибробласты [16]. Кроме того, MMP синтезируются эндотелиальными и гладкомышечными клетками [13, 18–20]. Однако на сегодняшний день существует крайне мало литературных данных, описывающих продукцию MMP кардиомиоцитами. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования секретируют MMP, причем их уровень изменяется в зависимости от срока культивирования.

Поскольку MMP-9 является металлопротеиназой, характерной для реакции на стресс и воспаление [39–45], мы полагаем, что ее накопление на ранних сроках культивирования кардиомиоцитов (с 5 по 10-е сут культивирования) связано с адаптацией клеток к непривычным для них условиям в культуре. Указанные сроки соответствуют реорганизации сократительного аппарата кардиомиоцитов с полным исчезновением миофибрилл и появлением структур немышечного типа. Такая реорганизация сопровождается временной утратой сократительной способности [7, 8]. Начальные стадии восстановления миофибрилярного аппарата кардиомиоцитов и способности к сокращению сопровождаются снижением уровня MMP-9. В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что подавление MMP-9 улучшает сократи-

тельную способность кардиомиоцитов [46–49], а также приводит к повышению выживаемости и дифференцировки стволовых клеток сердца в кардиомиоциты [50]. Процесс дифференцировки кардиомиоцитов сопровождается появлением новых миофибрилл, как и в случае восстановления сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. Таким образом, показанная нами корреляция между снижением уровня MMP-9 и восстановлением миофибрилярного аппарата кардиомиоцитов согласуется с описанными в литературе данными.

Постепенное повышение уровня MMP-2 можно объяснить накоплением наработанного кардиомиоцитами внеклеточного коллагена и необходимостью его пространственной организации. Согласно нашим ранее полученным данным, выраженные коллагеновые структуры во внеклеточном пространстве появляются на 10-е сут культивирования кардиомиоцитов [8]. Максимальный уровень MMP-2 (14-е сут культивирования) предшествует началу восстановления исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов и восстановлению их сократительной способности. На момент полного восстановления миофибрилярного аппарата кардиомиоцитов (22-е сут культивирования) наблюдается снижение уровня MMP-2, что также соответствует снижению общего количества внеклеточного матрикса [8]. Мы предполагаем, что снижение уровня MMP-2 связано с формированием кардиомиоцитами к этому сроку оптимального для них микроокружения и отсутствием необходимости его дальнейшего ремоделирования. Оптимальная пространственная организация внеклеточного матрикса позволяет клеткам восстанавливать исходную организацию сократительного аппарата и возвращаться к основной функции – сокращению.

При анализе MMP кардиомиоцитов в коллагеновых гелях мы наблюдали незначительное количество MMP-2 и MMP-9. Мы предполагаем, что низкий уровень желатиназ с отсутствием выраженной динамики в культуре кардиомиоцитов в коллагеновых гелях может объясняться наличием подходящего трехмерного микроокружения, позволяющего клеткам поддерживать естественное состояние их сократительного аппарата. Это предположение соответствует ранее полученным данным о непрерывном поддержании исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в трехмерных коллагеновых гелях [9]. Наши данные согласуются с данными других авторов, показавших на кардиомиоцитах из сердец взрослых свиней, что через сутки после помещения клеток в различные системы культивиро-

вания в трехмерном матриксе наблюдается минимальный синтез ММП по сравнению с различными двумерными подложками [21].

Таким образом, мы показали, что при накоплении компонентов внеклеточного матрикса в монослойной культуре кардиомиоцитов происходит повышение уровня ММП-2 и снижение уровня ММП-9. При этом при наличии готового внеклеточного матрикса ММП секретируются на стабильно низком уровне. Полученные данные могут указывать на регуляцию секреции ММП со стороны внеклеточного матрикса. На клетках некоторых типов было показано, что наличие таких компонентов внеклеточного матрикса, как ламинин и фибронектин, может влиять на активность ММП [51–53]. Известно, что взаимодействие клеток с компонентами внеклеточного матрикса опосредуется трансмембранными белками – интегринами [54–56]. Исходно считалось, что основная функция интегринов заключается в обеспечении физической связи между сократительными структурами клеток и внеклеточным окружением [57, 58]. Однако в настоящее время хорошо известно, что интегрины также играют важную роль в передаче сигналов [59–62]. На сегодняшний день существует мало данных об интегрин-опосредованной передаче сигналов в миокарде. Однако было показано, что интегрины необходимы для нормаль-

ного развития и функционирования сердца и могут участвовать в регуляции экспрессии и синтеза белков в кардиомиоцитах [59, 62–64]. На основании описанных данных мы предполагаем, что интегрин-опосредованное взаимодействие кардиомиоцитов с компонентами внеклеточного матрикса не только принимает участие в регуляции динамики сократительного аппарата, но также может влиять на активность ММП, которые, в свою очередь, регулируют синтезированный кардиомиоцитами внеклеточный матрикс.

Поскольку изменения уровня ММП коррелируют с накоплением внеклеточного матрикса и динамикой сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре, мы предполагаем, что кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования синтезируют ММП для оптимальной пространственной организации внеклеточного матрикса, позволяющей им восстанавливать миофибрилярный аппарат и сократительную способность.

Авторы выражают благодарность доктору Софии Юрьевне Хайтлиной за плодотворные дискуссии и ценные замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00068).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов А.Б., Гончарова Е.И., Пинаев Г.П., Румянцев П.П. (1989) Изменения локализации α -актинина и миофибриллогенеза в кардиомиоцитах во время культивирования, *Цитология*, **31**, 642–646.
2. Nag, A.C., and Cheng, M. (1981) Adult mammalian cardiac muscle cells in culture, *Tissue Cell.*, **13**, 515–523.
3. Nag, A., Cheng, M., Fischman, D., and 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.
4. Atherton, B.T., Meyer, D.M., and Simpson, D.G. (1986) Assembly and remodeling of myofibrils and intercalated discs in cultured neonatal rat heart cells, *J. Cell Sci.*, **86**, 233–248.
5. Messerli, J., Eppenberger-Eberhardt, M., Rutishauser, B., Schwarb, P., von Arx, P., Koch-Schneidemann, S., Eppenberger, H., and Perriard, J. (1993) Remodelling of cardiomyocyte cytoarchitecture visualized by three-dimensional (3D) confocal microscopy, *Histochem.*, **100**, 193–202.
6. Nag, A.C., Lee, M.L., and 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.
7. Бильдюг Н.Б., Пинаев Г.П. (2013) Влияние ингибитора пролиферации цитозин-арабинозида на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов, *Клеточные культуры. Информационный бюллетень*, **29**, 36–42.
8. Бильдюг Н.Б., Пинаев Г.П. (2013) Зависимость организации сократительного аппарата кардиомиоцитов от внеклеточного матрикса, *Цитология*, **55**, 713–724.
9. Бильдюг Н.Б., Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2014) Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в коллагеновых гелях, *Цитология*, **56**, 822–827.
10. Brenner, C.A., Adler, R.R., Rappolee, D.A., Pedersen, R.A., and Werb, Z. (1989) Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development, *Genes Dev.*, **3**, 848–859.
11. Matrisian, L.M., and Hogan, B.L. (1990) Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodeling during mammalian development, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **24**, 219–259.
12. Woessner, J. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, *FASEB J.*, **5**, 2145–2154.
13. Spinale, F., Mukherjee, R., Fulbright, B., Hu, J., Crawford, F., and Zile, M. (1993) Contractile properties of isolated porcine ventricular myocytes, *Cardiovasc. Res.*, **27**, 304–311.
14. Werb, Z., and Alexander, C. (1993) Proteinases and matrix degradation, in *Textbook of rheumatology*, Saunders, N.Y., pp. 248–268.
15. Tyagi, S., Kumar, S., and Glover, G. (1995) Induction of tissue inhibitor and matrix metalloproteinases by serum in

- human heart-derived fibroblast and endomyocardial endothelial cells, *J. Cell. Biochem.*, **58**, 360–371.
16. Herron, G., Werb, Z., Dwyer, K., and Banda, M. (1986) Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **261**, 2810–2813.
 17. Wilhelm, S., Eisen, A., Clark, S., Kronberger, A., and Goldberg, G. (1986) Human fibroblast collagenase: glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 3756–3760.
 18. Galis, Z., Muszynski, M., Sukhova, G., Simon-Morrissey, E., Unemori, E., Lark, M., Amento, E., and Libby, P. (1994) Cytokine stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion, *Circ. Res.*, **75**, 181–189.
 19. Chapman, R.E., Scott, A.A., Deschamps, A.M., Lowry, A.S., Stroud, R.E., Ikonomidis, J.S., and 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.
 20. Camelliti, P., Borg, T.K., and Kohl, P. (2005) Structural and functional characterization of cardiac fibroblasts, *Cardiovasc. Res.*, **65**, 40–51.
 21. Coker, M.L., Doscher, M.A., Thomas, C.V., Galis, Z.S., and Spinale, F.G. (1999) Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations, *Am. J. Physiol.*, **277** (2 Pt 2), 777–787.
 22. Bax, N.A., van Marion, M.H., Shah, B., Goumans, M.J., Bouten, C.V., and van der Schaft, D.W. (2012) Matrix production and remodeling capacity of cardiomyocyte progenitor cells during *in vitro* differentiation, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **53**, 497–508.
 23. Chandrakasan, G., Torchia, D.A., and 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.
 24. Oliver, G.W., Stettler-Stevenson, W.G., and Kleiner, D.E. (1999) Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors, in *Handbook of proteolytic enzymes*, Academic Press, San Diego, pp. 61–76.
 25. Воронкина И.В., Харисов А.М., Блинова М.И., Парамонов Б.А., Поточкин И.Л., Пинаев Г.П. (2002) Исследование протеолитической активности раневых эксудатов на модели воздушного пузыря у мышей, *Цитология*, **44**, 270–276.
 26. Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J.J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G., and Nagase, H. (1990) Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties, *Eur. J. Biochem.*, **194**, 721–730.
 27. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
 28. Woessner, J. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, *FASEB J.*, **5**, 2145–2154.
 29. Dickson, S.R., and 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.
 30. Werb, Z., Alexander, C.M., and Adler, R.R. (1992) Expression and function of matrix metalloproteinases in development, *Matrix Suppl.*, **1**, 337–343.
 31. Takahashi, S., Barry, A.C., and Factor, S.M. (1990) Collagen degradation in ischemic rat hearts, *Biochem. J.*, **265**, 233–241.
 32. Coker, M.L., Thomas, C.V., Clair, M.J., Hendrick, J.W., Krombach, R.S., Galis, Z.S., and Spinale, F.G. (1998) Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure, *Am. J. Physiol.*, **274**, 1516–1523.
 33. Spinale, F.G., Coker, M.L., Thomas, C.V., Walker, J.D., Mukherjee, R., and Hebbar, L. (1998) Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocytes function, *Circ. Res.*, **82**, 482–495.
 34. Thomas, C., Coker, M.L., Zellner, J.L., Handy, J.R., Crumbley, A.J., and Spinale, F.G. (1998) Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy, *Circulation*, **97**, 1708–1715.
 35. Spinale, F.G., Coker, M.L., Krombach, S.R., Mukherjee, R., Hallak, H., Houck, W.V., Clair, M.J., Kribbs, S.B., Johnson, L.L., Peterson, J.T., and Zile, M.R. (1999) Matrix metalloprotease inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and functions, *Circ. Res.*, **85**, 364–376.
 36. Spinale, F.G. (2002) Matrix metalloprotease: regulation and dysfunction in the failing heart, *Circ. Res.*, **90**, 520–530.
 37. Wang, T.L., Yang, Y.H., Chang, H., and Hung, C.R. (2004) Angiotensin II signals mechanical stretch-induced cardiac matrix metalloproteinase expression via JAK-STAT pathway, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **37**, 785–794.
 38. Mishra, P.K., Tyagi, N., Sen, U., Joshua, I.G., and Tyagi, S.C. (2010) Synergism in hyperhomocysteinemia and diabetes: role of PPAR gamma and tempol, *Cardiovasc. Diabetol.*, **9**, 49.
 39. Koivukangas, V., Kallioinen, M., Autio-Harmainen, H., and Oikarinen, A. (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin *in vivo*, *Acta Derm. Venereol.*, **74**, 279–282.
 40. Richard, D., Hollender, P., and Chenais, B. (2002) Involvement of reactive oxygen species in aclarubicin-induced differentiation and invasiveness of HL-60 leukemia cells, *Int. J. Oncol.*, **21**, 393–399.
 41. Onoue, S., Kobayashi, T., Takemoto, Y., Sasaki, I., and Shinkai, H. (2003) Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation, *J. Dermatol. Sci.*, **33**, 105–111.
 42. Woo, C.H., Lim, J.H., and Kim, J.H. (2004) Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells, *J. Immunol.*, **173**, 6973–6980.
 43. Dong, K.K., Damaghi, N., Picart, S.D., Markova, N.G., Obayashi, K., Okano, Y., Masaki, H., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Smiles, K.A., and Yarosh, D.B. (2008) UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin, *Exp. Dermatol.*, **17**, 1037–1044.
 44. Hsieh, H.L., Wang, H.H., Wu, W.B., Chu, P.J., and Yang, C.M. (2010) Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- κ B pathways, *J. Neuroinflammation*, **7**, 88.
 45. Hsieh, H.L., Lin, C.C., Shih, R.H., Hsiao, L.D., and Yang, C.M. (2012) NADPH oxidase-mediated redox signal contributes to lipoteichoic acid-induced MMP-9 upregulation in brain astrocytes, *J. Neuroinflammation*, **9**, 110.
 46. 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., and Yue, T.L. (2002) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by targeted

- deletion of matrix metalloproteinase-9, *Cardiovasc. Res.*, **54**, 549–558.
47. Fingleton, B. (2007) Matrix metalloproteinases as valid clinical targets, *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 333–346.
 48. Fingleton, B. (2008) MMPs as therapeutic targets – still a viable option? *Semin. Cell Dev. Biol.*, **19**, 61–68.
 49. Mishra, P.K., Metreveli, N., and 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.
 50. Mishra, P.K., Chavali, V., Metreveli, N., and Tyagi, S.C. (2012) Ablation of MMP9 induces survival and differentiation of cardiac stem cells into cardiomyocytes in the heart of diabetics: a role of extracellular matrix, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **90**, 353–360.
 51. Turpeenniemi-Hujanen, T., Thorgeirsson, U., Rao, C., and Liotta, L. (1986) Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells, *J. Biol. Chem.*, **261**, 1883–1889.
 52. Werb, Z., Tremble, P., Behrendtsen, O., Crowley, E., and Damsky, C. (1989) Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression, *J. Cell Biol.*, **109**, 877–889.
 53. Seftor, R., Seftor, E., Gehlsen, K., Stetler-Stevenson, W., Brown, P., Ruoslahti, E., and Hendrix, M. (1992) Role of avb3 integrin in human melanoma cell invasion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1557–1561.
 54. Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, **69**, 11–25.
 55. 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.
 56. Hemler, M. (1999) Integrin associated proteins, *Curr. Opin. Biol.*, **10**, 585–587.
 57. Corda, S., Samuel, J.L., and Rappaport, L. (2000) Extracellular matrix and growth factors during heart growth, *Heart Fail. Rev.*, **5**, 119–130.
 58. Sarasa-Renedo, A., and Chiquet, M. (2005) Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **15**, 223–230.
 59. Clark, E.A., and Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken, *Science*, **268**, 233–239.
 60. Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (1997) Integrin signaling in vascular biology, *J. Clin. Invest.*, **100**, 91–95.
 61. Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling, *Science*, **285**, 1028–1032.
 62. Ross, R.S., and Borg, T.K. (2001) Integrins and the myocardium, *Circ. Res.*, **88**, 1112–1119.
 63. Eble, D., and Spinale, F. (1995) Contractile and cytoskeletal content, structure, and mRNA levels with tachycardia-induced cardiomyopathy, *Am. J. Physiol.*, **268**, 2426–2439.
 64. Janmey, P. (1998) The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling, *Physiol. Rev.*, **78**, 763–781.

MATRIX METALLOPROTEINASES IN PRIMARY CULTURE OF CARDIOMYOCYTES

N. B. Bildyug*, I. V. Voronkina, L. V. Smagina,
N. M. Yuditseva, G. P. Pinaev

*Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences,
Tikhoretsky prosp. 4, Saint Petersburg 194064, Russia;
fax: +7(812)297-0341, E-mail: relapse@yandex.ru*

Received March 6, 2015
Revision received June 11, 2015

The highly organized contractile apparatus of cardiomyocytes in heart tissue allows for their continuous contractility, whereas extracellular matrix components are synthesized and spatially organized by fibroblasts and endothelial cells. However, reorganization of the cardiomyocyte contractile apparatus occurs upon their 2D cultivation, which is accompanied by transient loss of their contractility and acquired capability of extracellular matrix synthesis. In this study, matrix metalloproteinases were investigated at different times of cardiomyocyte 2D cultivation and 3D cultivation in collagen gels. It is shown that cardiomyocytes in 2D culture synthesize matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9, wherein their amount varies with the cultivation time. The peak MMP-9 amount is at early cultivation time, when the reorganization of cardiomyocyte contractile apparatus occurs, and the MMP-2 peak precedes the recovery of the initial organization of their contractile apparatus. Upon cardiomyocyte cultivation in 3D collagen gels, in which case their contractile apparatus does not rearrange, steady small amount of MMP-2 and MMP-9 is observed. These data indicate that the cardiomyocyte contractile apparatus reorganization in culture is associated with synthesis and spatial organization of their own extracellular matrix.

Key words: cardiomyocytes, matrix metalloproteinases, collagen gels