

СТРУКТУРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ДИССОЦИИРОВАННЫХ СКЕЛЕТНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МИОЦИТОВ ЛЯГУШКИ В УСЛОВИЯХ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

© Г. А. Наследов, Н. В. Томилин, В. И. Лукьяненко, Д. А. Терентьев

Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН и Институт токсикологии МЗ РФ, Санкт-Петербург

У эмбриональных скелетных миоцитов лягушки с 1-х по 10-е сут культивирования в условиях разреженной клеточной культуры, при которых предотвращается слияние миоцитов в миотрубки, изучали развитие сократительного аппарата и внутриклеточных мембранных структур, ответственных за электромеханическую связь. Для выявления мембранных структур, сохраняющих контакт с наружной средой, использовали рутениевый краситель. Маркированные мембранные структуры (везикулы и короткие трубочки) были видны вблизи поверхностной мембраны миоцитов уже в 1-е сут культивирования. В ходе культивирования миоцитов возрастало отношение площади поверхности внутриклеточных мембранных структур, маркированных рутениевым красным, к площади поверхности наружной мембраны, что свидетельствует о прогрессивном развитии Т-системы миоцитов. Триады появлялись к 6-м сут культивирования, одновременно с образованием саркомеров. Формирование сократительного аппарата миоцита начиналось с появления в субмембранной цитоплазме коротких пучков филаментов. На 3-и сут культивирования появлялись пучки филаментов, в которых различались анизотропная и изотропная зоны. К 6-м сут наблюдались миофибриллы с высокоорганизованными саркомерами, занимающие значительную часть саркоплазмы. На 8—10-е сут объем миоцитов, содержащих сократительные элементы, продолжал увеличиваться, но при этом обнаруживались дегенеративные изменения клетки — дезорганизация саркомеров, набухание трубочек Т-системы. Из полученных результатов следует, что слияние миоцитов в миотрубки не является необходимым условием образования в мышечных клетках сократительного аппарата с развитыми саркомерами и специализированных мембранных структур (триад), обеспечивающих электромеханическое сопряжение.

Известно, что образующиеся из сомитов скелетные миобласты при нормальном развитии рано сливаются, образуя миотрубки. Это событие, по-видимому, вызывает экспрессию генов, в результате чего начинаются интенсивный синтез сократительных белков и образование филаментов (Holtzer, 1970; Подлубная, 1981; Pinney et al., 1988). Слияние миобластов — необходимая стадия развития мышечных волокон, однако оно не является обязательным условием развития сократительного аппарата. Известно, что в культивируемых мышечных клетках, слияние которых предотвращается, также экспрессируются специализированные мышечные белки и в некоторой степени дифференцируются саркомеры (Okazaki, Holtzer, 1996; Shainberg et al., 1971; Zubrzycka, Mac Lennan, 1976; Kidokoro, Saito, 1988). Физиологическими методами было показано сопряжение процессов возбуждения и сокращения в культивируемых одиночных миоцитах крысы, не сливающихся в миотрубки, что предполагает развитие в них специализированных мембранных структур (Constantin et al., 1995).

Развитие сократительного аппарата в культивируемых отдельных миоцитах амфибий в отличие от миоцитов млекопитающих и птиц исследовано недостаточно. Образование и дифференцировка мембранных структур, ответственных за электромеханическую связь (ЭМС), у миоцитов в условиях клеточной культуры также практически не изучены. Между тем широкое использование дефинитивных мышц амфибий в различных исследованиях и накопленные всесторонние знания о функционировании и строении их мышц делают изучение раннего миогенеза у амфибий особенно актуальным.

В настоящей работе с использованием рутениевого красного в качестве маркера мембранных структур, контактирующих с внеклеточной средой, исследовали структурную дифференциацию культивируемых миоцитов травяной лягушки *Rana temporaria* в условиях, препятствующих их слиянию в миотрубки.

Материал и методика

Объектом исследования служили клетки миотома эмбрионов и диссоциированные миоциты лягушки в первичной культуре при длительном культивировании от 1 до 10 сут. Из эмбрионов лягушки, находящихся на стадии ранней нейрулы (27-я стадия эмбрионального развития по Дабагяну и Слепцовой, 1975), вырезали дорсальные участки. Для приготовления культуры диссоциированные клетки эмбриона высевали на покровные стекла, помещенные в чашки Петри диаметром 40 мм. Клетки культивировали в среде 199М, разбавленной деионизированной дистиллированной водой и содержащей 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина; разбавление среды 199М необходимо для получения тоничности, соответствующей таковой внутриклеточной среды амфибий. Используемая культуральная среда исключает возможность деления миоцитов (Taylor-Papadimitriou, Rosengurt, 1979). Подробно приготовление первичной культуры миоцитов описано ранее (Lukyanenko et al., 1993).

Для электронно-микроскопического исследования спинки эмбрионов лягушки или культивируемые клетки на покровных стеклах фиксировали 2.5%-ным раствором глутаральдегида на 0.1 М натрий-какодилатном буфере, рН 7.2, в течение 60 мин при комнатной температуре. После короткой промывки натрий-какодилатным буфером, содержащим сахарозу (0.034 г/мл), образцы дофиксировали в 1%-ном растворе OsO_4 на том же буфере при 4 °С 60 мин.

Для маркирования поверхностной мембраны и внутренних мембран клетки, сохраняющих контакт с внешней средой, использовали рутениевый красный в составе альдегидного и осмиевого фиксаторов (Luft, 1966). Концентрация рутениевого красного в фиксирующих растворах составляла 0.05 %.

После дегидратирования в растворах этанола возрастающих концентраций и ацетоне образцы заключали в Аралдит.

Для приготовления препаратов с клетками культуры желатиновые капсулы, заполненные Аралдитом, помещали на клетки, находящиеся на покровном стекле и отобранные с помощью бинокулярного микроскопа при малом увеличении. После полимеризации Аралдита (24 ч при 60 °С) стекло открепляли от него путем кратковременного погружения в жидкий азот. Ультратонкие срезы толщиной около 100 нм изготавливали на ультрамикротоме. Срезы монтировали на бленды и сетки и затем контрастировали: на блендах — цитратом свинца, а на сетках — уранил-ацетатом и цитратом свинца. Для исследования ультраструктуры клеток миотома эмбрионов лягушки изготавливали срезы под углом 45° к оси тела эмбриона. Культивируемые клетки резали параллельно поверхности покровного стекла. Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100B при 80 кВ. Увеличение электронного микроскопа определяли с помощью реплики дифракционной решетки (700 линий на 1 мм).

При малом увеличении (1200×) фотографировали участки срезов клеток культуры, а при большом (31 000×) — структуры, маркированные рутениевым красным. На фотопластинках (1200×) определяли величину поверхности миоцита в единице тестового объема. При большом увеличении (31 000×) определяли величину поверхности структур, маркированных рутениевым красным, и пересчитывали на единицу тестового объема с учетом разницы увеличений. В этих исследованиях использовали квадратную сетку с шагом 0.41 см, которую накладывали на фотопластинки под оптимальными для анизотропных структур углами к длинной оси миоцитов — 19 или 71° (Eisenberg et al., 1974). Для каждого суток культивирования исследовали не менее 5 клеток.

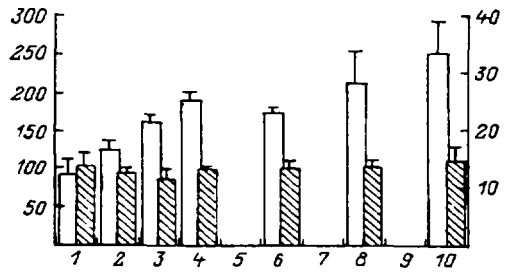
Стекла размером 24 × 24 мм с фиксированными на них клетками, помещенные в 96%-ный этанол, в ходе дегидратирования просматривали в световом микроскопе, при этом подсчитывали общее число веретенообразных клеток и измеряли их длину и ширину. Измерения проводили на 4—5 стеклах для каждого срока культивирования.

Результаты

Клетки миотома эмбриона лягушки. Форма клеток миотома неправильная, иногда клетки слегка вытянуты. Крупные ядра, занимающие обычно центральную часть клеток, также имеют неправильную форму. Они содержат 1 или 2 округлых ядрышка. Хроматин в основном представлен эухроматином. Гетерохроматин распределен по ядру диффузно в виде небольших электронно-плотных участков. В просветленной цитоплазме видны скопления мелких гранул, по-видимому рибосом и гликогена. Мембранные органеллы немногочисленны. Для небольших митохондрий характерна конденсированная конфигурация: электронно-прозрачное межмембранное пространство и электронно-плотный темный матрикс. В цитоплазме клеток много гранул двух типов: мелкие (0.3—0.5 мкм) темные (осмиофильные) — лизосомы — и крупные (1.5—5.0 мкм), более светлые —

Рис. 3. Изменение длины (светлые столбики) и ширины (заштрихованные столбики) миоцитов в ходе их культивирования.

По оси абсцисс — срок культивирования, сут. По оси ординат: левая шкала — длина миоцитов, мкм; правая шкала — ширина миоцитов, мкм. Вертикальные отрезки — 95 %-ные доверительные интервалы средних значений.



липосомы (желточные капли) (рис. 1, а; см. вкл. VIII). Рутениевый красный маркирует поверхностную мембрану клеток миотома в виде тонкого электронно-плотного слоя, а также проникает в межклеточные промежутки (рис. 1, б).

Диссоциированные миоциты в культуре. На основании светооптических исследований установлено, что миоциты в условиях клеточной культуры имеют веретенообразную форму с отростками различной длины и ширины (рис. 2). С увеличением срока культивирования ширина клеток остается практически постоянной, возрастает в основном длина миоцитов. Форма поперечных срезов в центральной части близка к округлой, соотношение ширины и толщины клеток около 3/4. Длина клеток с течением времени увеличивается от 100 мкм в 1-е сут культивирования до 250 мкм на 10-е сут (рис. 3). В 1-е сут прикрепленных миоцитов немного. Их количество возрастает до 6-х сут культивирования, затем на 8-е и 10-е сут резко уменьшается (рис. 4). Миоциты располагаются на стекле либо поодиночке, либо небольшими группами.

В 1-е сут культивирования ультраструктура миоцитов сходна с таковой клеток миотома эмбрионов. В клетках также много гранул: мелких (осмиофильных) — лизосом — и крупных, со слоистой внутренней структурой — липосом. Липосомы в культивируемых миоцитах в отличие от липосом в клетках эмбрионов бывают двух видов: низкой электронной плотности, сравнимой с плотностью цитоплазмы, и значительно более электронно-плотные, осмиофильные (рис. 5, а).

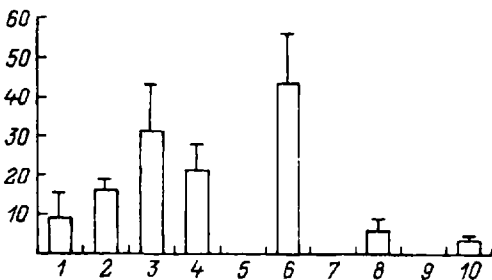
Рутениевый красный маркирует всю поверхность клеток в виде тонкого электронно-плотного слоя. В периферической цитоплазме миоцитов 1-х сут встречаются одиночные короткие пучки филаментов толщиной около 10—15 нм, не наблюдаемые в миобластах эмбрионов (рис. 5, б). Вблизи поверхностной мембраны видны округлые везикулы или вытянутые в виде коротких трубочек мембранные структуры, содержащие рутениевый красный. Группы везикул могут образовывать небольшие цепочки. В последующие сутки культивирования миоцитов количество пучков филаментов на их периферии увеличивается. Мембранные структуры, окрашенные рутениевым красным, встречаются как в виде везикул, так и в виде протяженных структур, ориентированных продольно оси клетки (рис. 5, в).

На 3-и сут культивирования миоцитов протяженные тубулярные структуры в них целиком или частично заполнены электронно-плотным содержимым. В местах, свободных от него, на внутренней поверхности мембран тубулярных структур виден тонкий слой рутениевого красного (рис. 6, а; см. вкл. VIII). Иногда можно наблюдать выход электронно-плотного материала из каналов во внеклеточную

среду (рис. 6, б). Количество периферически расположенных пучков миофиламентов в миоцитах заметно увеличивается, и они имеют более упорядоченный характер.

Рис. 4. Изменение количества миоцитов, прикрепленных к стеклу, в ходе их культивирования.

По оси абсцисс — срок культивирования, сут; по оси ординат — число клеток, прикрепленных к покровному стеклу размером 24×24 мм. Вертикальные отрезки — 95 %-ные доверительные интервалы средних значений.



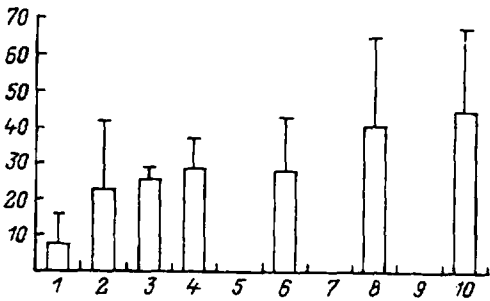


Рис. 8. Изменение отношения площади поверхности внутренних мембранных структур, маркированных рутениевым красным, к площади поверхности наружной мембраны миоцитов в ходе их культивирования.

По оси абсцисс — сроки культивирования, сут; по оси ординат — отношение площадей, %. Вертикальные отрезки — 95 %-ные доверительные интервалы средних значений.

доченное строение, иногда образуя короткие (2—3 саркомера) миофибриллы. В некоторых случаях можно наблюдать уже вполне различные изотропную и анизотропную зоны саркомеров (I- и A-зоны). В местах контакта двух саркомеров иногда видны небольшого размера плотные тела (рис. 6, в).

На 4-е сут культивирования структур с плотным содержимым в миоцитах не встречалось. Канальцы, содержащие рутениевый красящий, располагаются дальше от поверхностной мембраны. Число пучков коротких миофибрилл с плохо различимой Z-линией увеличивается, при этом пучки смещаются к центру миоцита (рис. 6, з). В центре клетки присутствуют вакуоли, на внутренней поверхности мембран которых откладывается рутениевый красящий (рис. 6, д). Количество липосом, особенно электронно-плотных, на 4-е сут заметно уменьшается.

На 6-е сут культивирования преимущественно в центральной области цитоплазмы миоцитов появляются миофибриллы с хорошо дифференцированными саркомерами, заполняющие значительную часть объема клетки и ориентированные параллельно ее продольной оси. В саркомерах хорошо различимы все основные зоны, в том числе Z-линия, H-зона и M-полоска. Длина саркомера составляет около 1.0—1.3 мкм. Напротив Z-линий видны триады, в которых хорошо различимы поперечно расположенные маркированные рутениевым красным канальцы T-системы и терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума (рис. 7, а; см. вкл. IX).

На 8-е сут наблюдается некоторая дезорганизация саркомеров. Поперечно расположенные каналы T-системы набухают. Локальные расширения встречаются и в продольно расположенных каналах T-системы, маркированных рутениевым красным (рис. 7, б).

На 10-е сут культивирования в миоцитах наблюдается полная дезорганизация миофибрилл: пучки миофиламентов утрачивают правильную продольную ориентацию (рис. 7, в), а в отрезках клетки видны крупные миелопоподобные тела (рис. 7, г). Однако при этом доля объема клетки, занятая сократительными элементами, продолжает увеличиваться.

Отношение площади поверхности внутриклеточных структур, маркированных рутениевым красным, к площади поверхности наружной мембраны миоцита с ростом срока культивирования увеличивается (рис. 8).

Обсуждение

Ультраструктура клеток миотома эмбрионов лягушки (27-я стадия эмбрионального развития) позволяет считать их малодифференцированными клетками с большим запасом желточных гранул (липосом) и лизосом, что свойственно эмбриональным клеткам в ранние сроки развития. После высевания в чашки Петри клетки прикрепляются к поверхности покровных стекол и начинают дифференцироваться. В 1-е сут культивирования структура миоцитов очень близка таковой клеток миотома эмбриона. Но уже в 1-е сут культивирования можно отметить признаки дифференцировки клеток: они приобретают веретенообразную форму, в них появляются короткие пучки миофиламентов, маркированные рутениевым

красным везикулы и короткие трубочки в субмембранной зоне цитоплазмы. Поскольку в исследуемой культуре во все сроки культивирования отсутствовали нервные клетки, можно считать, что дифференцирующиеся миоциты лишены нейротрофического влияния. До 6-х сут культивирования количество клеток, прикрепленных к стеклу, возрастало, на 8-е и 10-е сут оно резко снижалось. Открепление клеток обычно вызывается их гибелью и часто используется в качестве показателя состояния культуры (Walum, Peterson, 1984). Вероятно, в подобных условиях культивирования используемые в настоящей работе клетки не могут сохраняться более 10 сут и гибнут в силу либо отсутствия слияния в миотрубки, либо отсутствия нейротрофических влияний. Несмотря на гибель значительной части клеток, длина клеток, оставшихся прикрепленными к покровному стеклу, продолжает увеличиваться, что свидетельствует о продолжающейся дифференцировке. При электронно-микроскопическом исследовании миоцитов в них на 8-е сут культивирования обнаружены локальные расширения продольных и набухание поперечных каналов Т-системы, а на 10-е сут — миелиноподобные тела в отростках и дезорганизация миофибрилл в околядерной зоне цитоплазмы. Эти изменения свидетельствуют о начинающейся дегенерации культивируемых клеток. Таким образом, до 10-х сут включительно миоциты в исследуемой культуре продолжали дифференцироваться, несмотря на появляющиеся после 8-х сут признаки дегенерации.

Дифференцировка сократительного аппарата культивируемых клеток. Отдельные группы филаментов, расположенные в периферической зоне миоцитов, появляются уже в 1-е сут культивирования в виде коротких пучков толстых (около 10 нм), похожих на миозиновые филаментов. Тонкие филаменты в это время встречаются в виде хаотично ориентированных нитей. Затем появляются пучки миофиламентов, в которых уже можно различить анизотропную и изотропную зоны. На 3-и и 4-е сут культивирования в клетках встречаются короткие миофибриллы с плохо выраженной Z-линией. И только на 6-е сут в околядерной цитоплазме миоцитов были обнаружены миофибриллы с хорошо дифференцированными саркомерами с четкой Z-линией, H-зоной и M-полоской. Обнаруженная в настоящей работе последовательность формирования и дифференцировки сократительных структур в культивируемых миоцитах лягушки в основном совпадает с таковой, наблюдавшейся в культурах миотрубок (Fischman, 1967; Kelly, 1969; Franzini-Armstrong, 1986; Flucher et al., 1991).

В настоящее время существуют две гипотезы о последовательности формирования миофибрилл. Согласно одной из них, образование сократительных структур инициируется примембранными миофиламентами (Auber, 1969; Kelly, 1969). Согласно другой гипотезе, ведущую роль в появлении миофибрилл играют плотные тела, материал которых используется в дальнейшем для образования Z-линий (Furst et al., 1989; Flucher, 1992). В исследованных в настоящей работе культивируемых миоцитах лягушки можно отметить ранее (в 1-е сут) появление периферически расположенных отдельных пучков филаментов, а затем (3—4-е сут) появление коротких миофибрилл. Плотные тела появились только на 3-и сут культивирования, когда Z-линия была еще неразличима. Ядра в миоцитах сохраняют центральное положение в течение всего исследованного срока культивирования.

Дифференцировка саркотубулярной системы. Рутениевый красный часто используется для контрастирования поверхностной мембраны клеток. Известно, что он связывается с анионными группами сиалогликопротеинов и гликозаминогликанов гликокаликса путем электростатических взаимодействий. Рутениевый красный плохо проникает через поверхностную мембрану, поэтому его используют для маркирования мембран, имеющих контакт с экстраклеточной средой (Frank et al., 1977). По нашим данным, отношение площади поверхности этих мембран к площади поверхностной мембраны клетки увеличивается с ростом срока культивирования, что свидетельствует о развитии и дифференцировке Т-системы в течение всего этого срока. Т-система возникает в виде расположенных по

периферии везикул, которые сливаются, образуя продольно ориентированные канальцы. Эти канальцы постепенно перемещаются к центру клетки, и дальнейшее развитие Т-системы связано с преобразованием их в поперечные каналы и образованием триад — контактов этих каналов с цистернами саркоплазматического ретикулума (СР). Удлинение канальцев происходит в миоцитах и в более поздние сроки их культивирования за счет субмембранных везикул, количество которых даже увеличивается. В целом можно заключить, что формирование каналов Т-системы в отдельных миоцитах лягушки в условиях культуры сходно с таковым в миотрубках, образующихся в культуре при более высокой плотности клеток (Flucher et al., 1991, 1993). Цистерны СР в миоцитах до 6-х сут встречались редко. Не удалось обнаружить описанные для миотрубок везикулярные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума и его связь с поверхностной мембраной миоцитов (Ezerman, Ischikawa, 1967; Flucher et al., 1994). На 6-е сут культивирования миоцитов СР входит в состав триад, а гранулярный ретикулум представлен протяженными цистернами.

На 3-и сут культивирования протяженные тубулярные структуры, маркированные рутением красным, оказываются целиком или частично заполненными электронно-плотным содержимым. В отдельных случаях наблюдается его выброс в экстраклеточное пространство. Такая серьезная структурная перестройка клеток не связана с их гибелью, поскольку до 6-х сут количество прикрепленных клеток возрастает. Выброс электронно-плотного содержимого трубочек происходит одновременно со снижением содержания липосом. Возможно, подобная перестройка миоцитов может быть связана с подготовкой к слиянию в миотрубки.

Таким образом, на основании полученных результатов можно прийти к выводу о том, что для образования относительно высокодифференцированных внутриклеточных мышечных мембранных систем (СР и Т-системы) и миофибрилл отдельные миоциты не обязательно должны сливаться с образованием миотрубок. Однако если такого слияния не происходит, то дифференцировка миоцитов, по-видимому, происходит нетипично: раньше появляются пучки толстых филаментов; задерживается формирование видимой Z-линии, длина саркомеров остается равной 1.2 мкм, что существенно меньше длины саркомеров в мышечных волокнах лягушки; ядро миоцитов в течение всего срока культивирования сохраняет центральное положение. В процессе дифференцировки саркотубулярной системы цистерны СР длительное время остаются немногочисленными, поэтому контакт цистерн СР с поверхностной мембраной в миоцитах отсутствует, а на 6-е сут культивирования уже образуются триады.

К 10-м сут культивирования на фоне явных дегенеративных изменений миоцитов резко снижается количество прикрепленных клеток, что свидетельствует о невозможности более длительного существования в культуре одиночных не сливающихся в миотрубки скелетных миоцитов, вероятно в силу отсутствия нейротрофических факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 96-04-50608).

Список литературы

Дабаян Н. В., Слепцова Л. А. Травяная лягушка. Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442—462.

Подлубная З. А. Формирование сократительных структур в миогенезе // Проблемы миогенеза. Л.: Наука, 1981. С. 51—74.

Auber J. La myofibrillogenese du muscle strie. II. Vertebres // J. Microsc. (Paris). 1969. T. 8. P. 367—390.

Constantin B., Cognard C., Raymond G. Myoblast fusion is not a prerequisite for the appearance of calcium current, calcium release, and contraction in rat skeletal muscle cells developing in culture // Exp. Cell Res. 1995. Vol. 217. P. 497—505.

Eisenberg B. R., Kuda A. M., Peter J. B. Stereological analysis of mammalian skeletal muscle. I. Soleus muscle of adult guinea pig // J. Cell Biol. 1974. Vol. 60. P. 732—754.

- Ezerman E. B., Ischikawa H.* Differentiation of the sarcoplasmic reticulum and T-system in development chick skeletal muscle in vitro // *J. Cell Biol.* 1967. Vol. 35. P. 405—419.
- Fischman D. A.* An electron microscope study of myofibril formation in embryon chick skeletal muscle // *J. Cell Biol.* 1967. Vol. 32. P. 557—575.
- Flucher B. E.* Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad // *Develop. Biol.* 1992. Vol. 154. P. 245—260.
- Flucher B. E., Andrews S. B., Daniels M. D.* Molecular organization of transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction during development of excitation-contraction coupling in skeletal muscle // *Mol. Biol. Cell.* 1994. Vol. 5. P. 1105—1118.
- Flucher B. E., Takekura H., Franzini-Armstrong C.* Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: association of sarcoplasmic reticulum and transverse tubules with myofibrils // *Develop. Biol.* 1993. Vol. 160. P. 135—147.
- Flucher B. E., Terasaki M., Chin H. M., Beeler T. J., Daniels M. P.* Biogenesis of transverse tubules in skeletal muscle in vitro // *Develop. Biol.* 1991. Vol. 145. P. 77—90.
- Frank J. S., Langer G. A., Nudd L. M., Seraydarian K.* The myocardial cell surface, its histochemistry, and the effect of sialic acid and calcium removal on its structure and cellular ionic exchange // *Circulat. Res.* 1977. Vol. 41. P. 702—714.
- Franzini-Armstrong C.* The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules // *Myology.* New York: McGraw-Hill, 1986. P. 125—153.
- Fürst D., Osborn M., Weber K.* Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of *tüin* in myofibril assembly // *J. Cell Biol.* 1989. Vol. 109. P. 517—527.
- Holtzer H.* Proliferation and a quantal cell cycle in the differentiation of muscle, cartilage and red blood cells // *Gene expression in somatic cells.* New York: Acad. Press, 1970. P. 69—88.
- Kelly D. E.* Myofibrillogenesis and Z-band differentiation // *Anat. Rec.* 1969. Vol. 163. P. 403—426.
- Kidokoro Y., Saito M.* Early cross-striation formation in twitching *Xenopus* myocytes in culture // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 1978—1988.
- Luft J. H.* Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red // *Fed. Proc.* 1966. Vol. 25. P. 1773—1783.
- Lukyanenko V. I., Katina I. E., Nasedov G. A., Lonsky A. V.* Voltage dependent ionic currents in frog cultured skeletal myocytes // *Gen. Physiol. Biophys.* 1993. Vol. 12. P. 231—247.
- Okazaki K., Holtzer H.* An analysis of myogenesis in vitro using fluorescein-labeled antimyosin // *J. Histochem. Cytochem.* 1966. Vol. 13. P. 726—739.
- Pinney D. F., Pearson-White S. H., Konieczny S. F., Latham K. E., Emerson C. P.* Myogenic lineage determination and differentiation: evidence for a regulatory gene pathway // *Cell.* 1988. Vol. 53. P. 781—793.
- Shainberg A., Yagil G., Yaffe D.* Alterations of enzymatic activities during muscle differentiation in vitro // *Develop. Biol.* 1971. Vol. 25. P. 1—29.
- Taylor-Papadimitriou J., Rosengurt E.* The role of thymidine uptake in the control of cell proliferation // *Exp. Cell Res.* 1979. Vol. 119. P. 393—396.
- Walum E., Peterson A.* On the application of the cultured neuroblastoma cells in chemical toxicity screening // *Toxicol. Environ. Health.* 1984. Vol. 13. P. 511—520.
- Zubrzycki E., Mac Lennan D. H.* Assembly of the sarcoplasmic reticulum: biosynthesis of calsequestrin in rat skeletal muscle cell cultures // *J. Biol. Chem.* 1976. Vol. 251. P. 7733—7738.

Поступила 17 II 1997

STRUCTURAL DIFFERENTIATION OF FROG EMBRYONIC SKELETAL MYOCYTES IN DISSOCIATED CELL CULTURE

G. A. Nasedov, N. V. Tomilin, V. I. Lukyanenko, D. A. Terentyev

Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, and Institute of Toxicology, St. Petersburg

The development of membrane structures, providing E-C coupling, and the contractile apparatus organization were investigated in frog skeletal myocytes cultured for 1 to 10 days in conditions preventing both myocyte division and fusion. Ruthenium red was used to determine the membranous structures being in contact with the extracellular environment. The marked membrane structures (vesicles and short tubules) appeared to be near the cell membrane on the first days of culturing. The increase in the ratio of the surface area of all internal membranous structures, marked by Ruthenium red, to the external membrane area with aging was proven by morphometric calculations, that means a progressive development. Contractile filaments were found near the cell membrane on the first days of development. Bundles of filaments with initial signs of sarcomere organization were observed on the 3rd—4th days, and myofibrils with highly organized sarcomeres occupied the main part of the sarcoplasm on the 6th day of culturing. The triads appeared also on the sixth day, being regularly inserted into the sarcomere structure. Degenerative signs in the myocytes (sarcomere disorganization and T-tubule swelling) were observed on the 8—10th days, but the area occupied by contractile elements was increased. These results show that the myocyte fusion into myotubules is not a necessary condition for either sarcomere formation, or the formation of all membranous structures providing the E-C coupling.