

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet8828
http://nvlvet.com.ua

UDC 57.085.2: 611.013: 611.127: 599.742.73

Methods of obtaining stem cells of the myocardium of cat

O.S. Kovpak, V.V. Kovpak, A.I. Mazurkevych

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Article info

Received 17.09.2018
Received in revised form
18.10.2018
Accepted 19.10.2018

National University of Life
and Environmental Sciences
of Ukraine, Heroyiv
Oborony Str., 15, Kyiv,
03041, Ukraine.
Tel.: +38-067-935-25-70
E-mail: kovpak8887@gmail.com

Kovpak, O.S., Kovpak, V.V., & Mazurkevych, A.I. (2018). Methods of obtaining stem cells of the myocardium of cat. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies, 20(88), 152–157. doi: 10.32718/nvlvet8828

Year 2003 may be considered as the beginning of the study of “stem cells of the adult heart”, when Beltrami A.P. with his colleagues finally confirmed the presence of the latter in the heart. Later, Makkar R.R. and others proved the efficacy of these cells for treatment of myocardial ischemia. However, despite the positive effect of the use of “stem cells of the adult heart” for myocardial ischemia, an obstacle to their global clinical use are the ethical issues and difficulty in obtaining. Given the above, the aim of our work was to determine the optimal method of obtaining stem cells from the myocardium of cat. The experiments on animals were performed in accordance with the requirements of the “General ethical principles for Experiments on Animals” adopted by the first National Congress on bioethics (dated 20.09.04, Kyiv, Ukraine). To obtain heart tissues the frozen fetuses of kittens, that remained after providing the birth assistance, were used (with the consent of the owners). In order to determine the optimal method for obtaining a stem cells culture of the myocardium of cat we compared the explant method and enzymatic treatment methods of tissues using different combinations of enzymes: 2 mg/ml of collagenase (type II); 2 mg/ml of collagenase (type II) supplemented with 5% bovine serum; 1 mg/ml of collagenase (type II), 1 mg/ml of hyaluronidase and 5% BSA; 2.5% of trypsin; 2.5% of trypsin, 0.5 mg/ml of collagenase (type II) and 0.5 mg/ml of hyaluronidase. In order to determine the optimal method for obtaining a cells culture of the myocardium the counting of the number of cells after the formation of monolayer in one of the experimental groups was carried out (day 5 since the beginning of the research). The counting of number of cells was performed in the Gorjaev's chamber under 200 magnification of microscope in all the squares. The most effective method for obtaining the stem cells culture from the myocardium is to use a combination of enzymes 2.5% of trypsin, 0.5 mg/ml of collagenase (type II) and 0.5 mg/ml of hyaluronidase, which allows to obtain 986.0 ± 9.3 thousand cells capable for proliferation with 10 mg of tissue. The least effective was the explant method (without use of enzymes), because the number of cells attached to the cultural plastic of the cells during its use on day 5 of cultivation was amounted 35.7 ± 6.2 thousand. The proposed method is optimal for obtaining the stem cells culture of the myocardium of the cat, which will be used later in our studies in the treatment of diseases of the heart muscle.

Key words: primary culture, stem cells of the myocardium, enzymatic treatment, explant method, cat.

До методики отримання стовбурових клітин міокарда котів

O.C. Kovpak, V.V. Kovpak, A.I. Mazurkevych

Національний університет біоресурсів і природокористування України, м. Київ, Україна

Початком дослідження стовбурових клітин серця можна вважати 2003 рік, коли Beltrami A.P. з колегами підтвердили наявність останніх у міокарді. Пізніше Makkar R.R. та ін. довели ефективність даних клітин за лікування ішемії міокарда. Проте, незважаючи на позитивний ефект від застосування міокардіальних стовбурових клітин за ішемії міокарда, перешкодою для їх масового клінічного застосування є етичні суперечності та складність в отриманні. Зважаючи на вищесказане, метою нашої роботи було визначення оптимального методу отримання стовбурових клітин з міокарду kota. Експерименти на тваринах були виконані відповідно до вимог “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, схвалених I Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна). Для отримання тканин серця використовували завімерлі плоди кошенят (за згоди господарів), що залишилися після надання рододопомоги. Для визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин міокарда kota нами було порівняно метод експланту та методи ферментативної обробки тканин з використанням різних комбінацій ферментів: 2 мг/мл колагенази (тип II); 2 мг/мл колагенази (тип II) з додаванням 5% бичачого сироваткового альбуміну (BSA);

1 мг/мл колагенази (тип II), 1 мг/мл гіалуронідази та 5% BSA; 2,5% трипсину; 2,5% трипсину, 0,5 мг/мл колагенази (тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази. Найбільш оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда вважали метод, за якого найшвидше утворювався моношар клітин у одній із чашок Петрі. При цьому враховували кількість клітин у моношарі, які підраховували у камері Горяєва за допомогою мікроскопу при збільшенні у 200 разів. Найбільш ефективним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда котів є використання комбінації ферментів: 2,5% трипсину, 0,5 мг/мл колагенази (тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази, що дозволяє з 10 мг тканин серця отримати $986,0 \pm 9,3$ тис. клітин, здатних до проліферації. Найменш ефективним виявився метод експланту (без використання ферментів), оскільки кількість прикріплених до культурального пластику клітин за його використання на 5 добу культивування складала $35,7 \pm 6,2$ тис.

Ключові слова: первинна культура, стовбурові клітини міокарда, ферментативна обробка, метод експланту, кіт.

Вступ

Тривалий час серце вважалось постмітогенним органом без здатності до регенерації, тому пошук стовбурових клітин у цьому органі вважався марним. Проте з часом почали з'являтися повідомлення про існування у шлуночках серця ссавців кількох видів, включаючи людей, міоцитів, що здатні до мітозу та цитокінезу в нормі та за патології (Kajstura et al., 1998; Beltrami et al., 2001). А вже в 2003 році Beltrami A.P. et al. (Beltrami et al., 2003) остаточно підтвердили наявність у серці так званих "дорослих стовбурових клітин серця", які, своєю чергою, володіють здатністю до самовідновлення, клоногенністю та є мультипотентними (здатні до диференціації у міоцити, гладку мускулатуру та ендотеліальні клітини) (Bearzi et al., 2007).

При введенні за інфаркту міокарда в серце міокардіальних стовбурових клітин ушкоджений серцевий м'яз регенерує, що відбувається завдяки утворенню нових судин і міоцитів з характеристиками молодих клітин, що охоплюють приблизно 70% ушкодженого шлуночка (Beltrami et al., 2003).

Makkar R.R. et al. (Makkar et al., 2012) відзначають, що за введення стовбурових клітин, отриманих з серцевої тканини, відмічають зменшення розміру рубця міокарда та утворення нових здорових тканин. Вказані дані спростовують теорію, що рубці серцевого м'яза є постійними і після втрати здорові серцеві м'язи не можуть бути відновлені.

Зважаючи на вищесказане, використання стовбурових клітин міокарда є перспективним методом лікування домашніх тварин із хворобами серця, викликаних дистрофічними змінами у міокарді. Проте, незважаючи на позитивний ефект від застосування міокардіальних стовбурових клітин за ішемії міокарда, перешкодою для їх масового клінічного застосування є етичні суперечності та складність в отриманні.

Мета роботи: визначити оптимальний метод отримання стовбурових клітин міокарда kota.

Матеріал та методи досліджень

Експерименти на тваринах були виконані відповідно до вимог "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", схвалених I Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна).

Для отримання тканин серця використовували зазвичай плоди кошенят (за згоди господарів), що залишалися після надання рододопомоги. Для отримання культури стовбурових клітин міокарда отримані

шматочки серця масою 10 мг вносили у пробірки та додавали 1 см³:

1) використовували модифікований метод експланту: шматочки тканин культивували у стандартному поживному середовищі (80% – середовище Ігла модифікованого Дюльбеко (DMEM), 20% – ембріональна сироватка ВРХ) з додаванням 10 мкл/см³ антибіотика-антимікотика);

2) 2 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США);

3) 2 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США) + 5% бичачого сироваткового альбуміну (BSA) (Sigma, США);

4) 1 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США) + 1 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія) + 5% BSA (Sigma, США);

5) 2,5% трипсину (Sigma, США);

6) 2,5% трипсину (Sigma, США) + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) (Sigma, США) + 0,5 мг/мл гіалуронідази (Life Global, Бельгія).

Пробірки з тканиною та розчинами № 1, 2, 3 та 4 поміщали у CO₂-інкубатор при t 37 °C на 1 годину, пробірки з тканиною та розчинами № 5 та 6 – у холодильнику при t 4 °C на 12 годин. Після закінчення визначеного часу їх піддавали центрифугуванню протягом 20 хв за відцентрової сили 300 g. Зливали надосадову рідину, а до осаду клітин вносили стандартне поживне середовище з додаванням 10 мкл/см³ антибіотика-антимікотика, розпіпетовували, переносили в чашки Петрі з поживним середовищем та ставили на культивування.

Найбільш оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда вважали метод, за якого найшвидше утворювався моношар клітин у одній із чашок Петрі. При цьому враховували кількість клітин у моношарі, які підраховували у камері Горяєва за допомогою мікроскопа при збільшенні у 200 разів. Підрахунок кількості клітин проводили в усіх квадратах камери та розраховували за формулою:

$$X = A \times 1000 / 0,9$$

де X – число клітин в 1 см³; A – число клітин у всіх квадратах; 1000 – кількість мм³ в 1 см³; 0,9 – об'єм камери Горяєва в мм³ (Masurkewitsch et al., 2014).

Пасажування клітин здійснювали у співвідношенні 1:2 за стандартною методикою. Мікроскопічний аналіз і оцінку культури здійснювали за допомогою інвертованого мікроскопа Axiovert 40 (Карл Цейс).

Результати та їх обговорення

Нині метод експланту вважається найбільш оптимальним для отримання первинної культури з малої

кількості тканини, адже ферментативна обробка може призвести до пошкодження клітин і, як наслідок, втрати їх життєздатності. Разом з тим ферментативний метод отримання первинної культури у разі правильного підбору комбінації ферментів та експозиції дозволяє отримати більший, порівняно з методом експланту, вихід клітин, здатних до проліферації. Саме тому для отримання культури стовбурових клітин міокарда kota ми порівнювали як метод експланту, так і ферментативну дезагрегацію. Зважаючи на

те, що для сепарації клітин серця науковці зазвичай використовують трипсин (Hynes and Walton, 2000; Shoulders and Raines, 2009), колагеназу (Speicher and McCarl, 1974; Makkar et al., 2012) і дещо рідше гіалуронідазу (Sharma et al., 2015), у своїх дослідженнях ми використовували саме ці ферменти.

Варто зазначити, що візуальна відмінність у формуванні колоній первинної культури міокарда kota залежала від методу, що був застосований для її отримання (рис. 1).

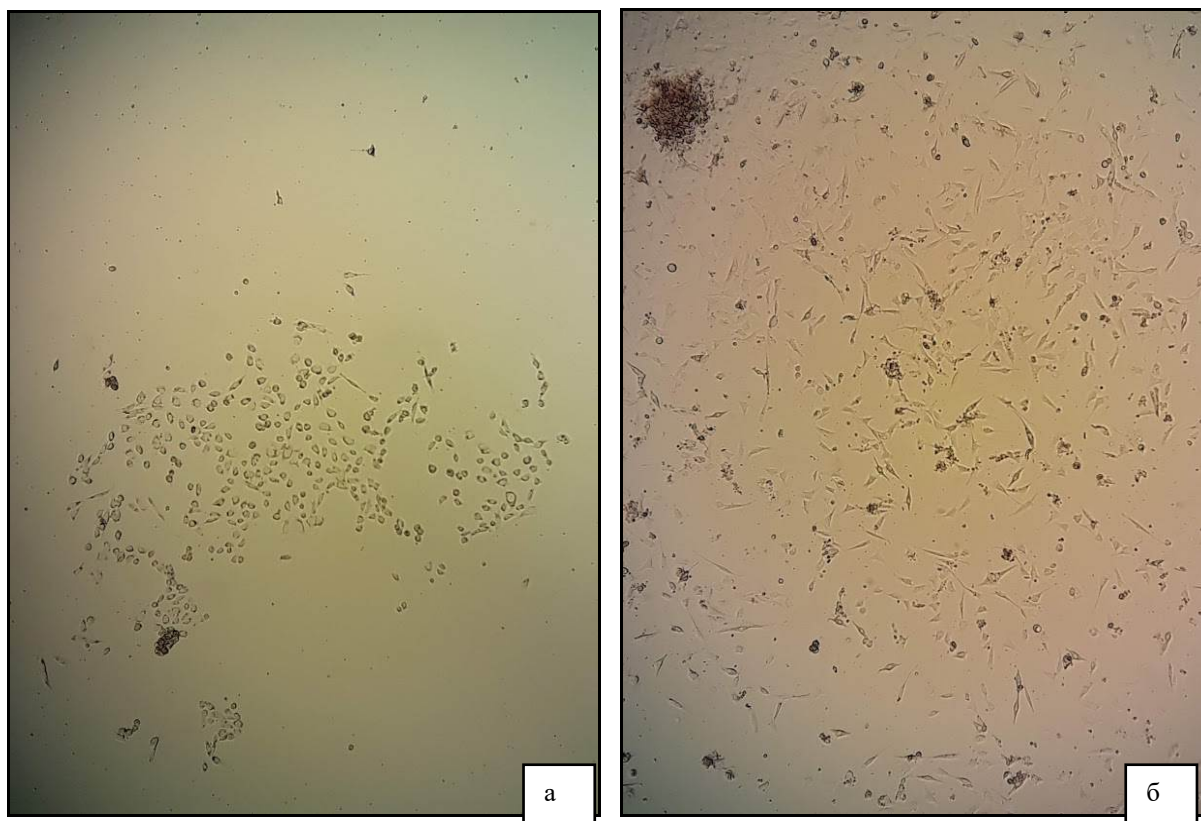


Рис. 1. Моношар культур стовбурових клітин міокарда kota за використання різних методів їх отримання (3 доба культивування, 0 пасаж): а) 1 метод (метод експланту); б) 6 метод (2,5% трипсину + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) + 0,5 мг/мл гіалуронідази). Нативний перпарат. Зб.: ×40

Вже на 3 добу культивування ми спостерігали відмінності у рості клітин. Так, за використання 1 методу (метод експланту) відмічали утворення поодиноких колоній (рис. 1, а). Водночас за використання 6 методу відмічали велику кількість клітин, що були дифузно прикріплені до культурального пластику (рис. 1,

б). При оцінці росту клітин у інших дослідних групах на 3 добу культивування виявляли як наявність колоній, так і поодиноких клітин.

Статистичні результати щодо отримання культури стовбурових клітин міокарда kota на 5 добу культивування наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Кількість стовбурових клітин міокарда kota в моношарі залежно від методу обробки первинного матеріалу, $M \pm m, n = 3$

| № методу | Метод обробки серцевої тканини | Кількість клітин на 5 добу культивування, тис. шт. |
|----------|---|--|
| 1 | Метод експланту (контроль) | 35,7 ± 6,2 |
| 2 | 2 мг/мл колагенази (тип II) | 560,3 ± 7,8*** |
| 3 | 2 мг/мл колагенази (тип II) + 5% BSA | 340,7 ± 15,8*** |
| 4 | 1 мг/мл колагенази (тип II) + 1 мг/мл гіалуронідази + 5% BSA | 276,0 ± 8,7*** |
| 5 | 2,5% трипсину | 175,0 ± 7,3*** |
| 6 | 2,5% трипсину + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) + 0,5 мг/мл гіалуронідази | 986,0 ± 9,3*** |

Примітки: *** – $P < 0,001$ порівняно з контролем

При оцінці статистичних даних, наведених в таблиці 1, та візуальних відмінностей, продемонстрованих на рисунку 2, можна стверджувати, що за ферментативної обробки тканин серця kota можна отримати достовірно більшу кількість клітин, здатних до проліферації, порівняно з використанням методу експланту (без застосування ферментів).

Так, обробка 10 мг отриманої тканини комбінацією ферментів 2,5% трипсину, 0,5 мг/мл колагенази

(тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази дозволила досягти 100% конфлюентності моношару на 5 добу культивування (рис. 2, б). Кількість клітин при цьому становила $986,0 \pm 9,3$ тис., що, своєю чергою, у 27,6 разу більше, ніж за використання методу експланту (контроль) (рис. 2, а). Варто зазначити, що даний метод виявився найефективнішим у процесі нашого дослідження.

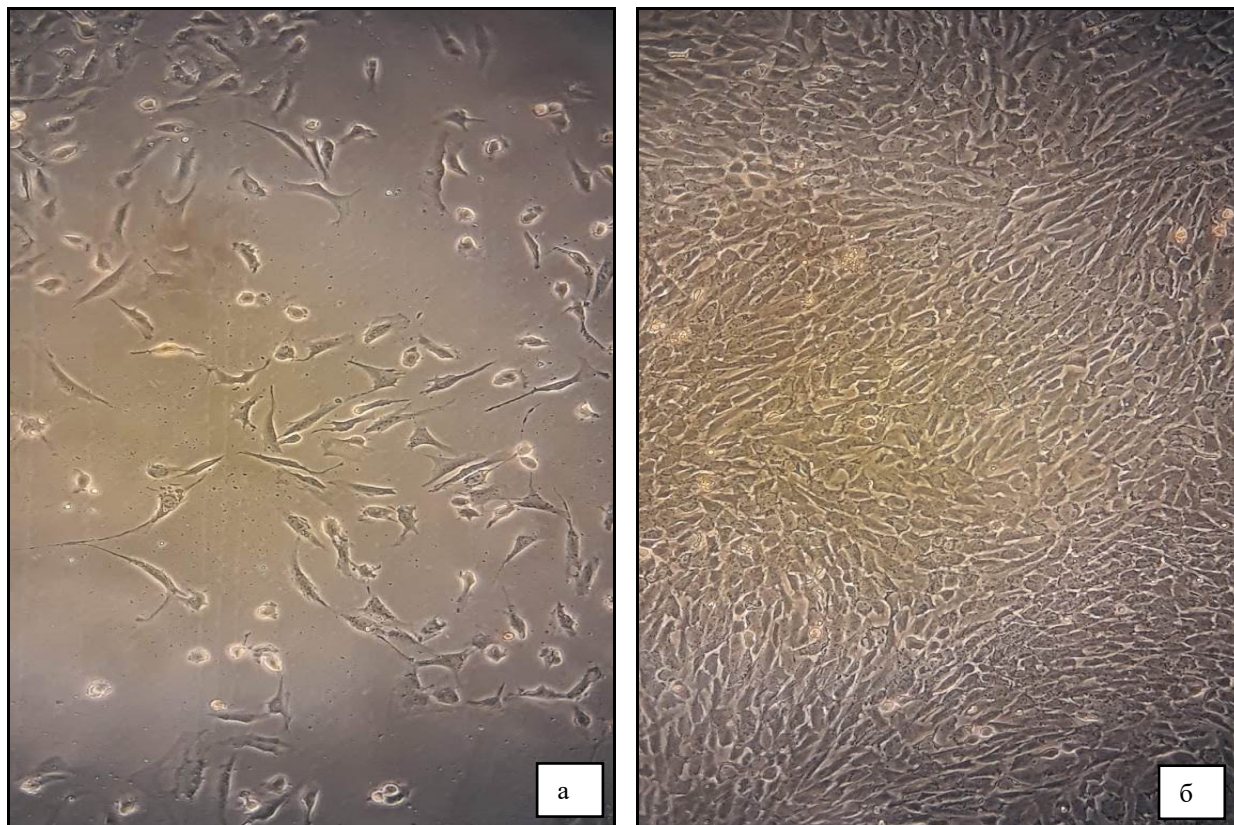


Рис. 2. Моношар культур стовбурових клітин міокарда kota за використання різних методів отримання (5 доба культивування, 0 пасаж): а) метод експланту (контроль); б) б метод (2,5% трипсину + 0,5 мг/мл колагенази (тип II) + 0,5 мг/мл гіалуронідази). Нативний перпарат. 36.: $\times 200$

Дещо нижчий вихід клітин, що здатні до проліферації, отримали за використання 2 мг/мл колагенази (тип II). За використання даного методу кількість клітин на 5 добу культивування складала $560,3 \pm 7,8$ тис., що у 15,7 разу більше, порівняно з контролем, проте у 1,8 разу менше, ніж за використання б методу обробки тканини.

Наступним за ефективністю був 3 метод обробки з використанням 2 мг/мл колагенази (тип II) з додаванням 5% BSA. Кількість клітин, здатних до проліферації, становила $340,7 \pm 15,8$, що у 9,5 разу більше, ніж за використання методу експланту.

Менш ефективними методами ферментативної обробки виявилися 4 (з додаванням 1 мг/мл колагенази (тип II) + 1 мг/мл гіалуронідази + 5% BSA) та 5 (з додаванням 2,5% трипсину) методи. Кількість клітин за використання 4 методу на 5 добу культивування становила $276,0 \pm 8,7$ тис., 5 методу – $175,0 \pm 7,3$ тис., що відповідно у 7,7 та 4,9 разів більше порівняно з контролем.

Зважаючи на те, що ефективність методу експланту в нашому дослідженні була найнижчою, доцільним буде розглянути вплив ферментів на тканину. Варто зазначити, що механізм дії трипсину, колагенази та гіалуронідази значно відрізняється. Так, трипсин – розщеплює С-термінальний аргінін та лізин (Lee et al., 2015), тобто здатний гідролізувати більшість білків. Гіалуронідаза – фермент, який здатний розщеплювати гіалуронову кислоту (Mukherjee et al., 2002) та збільшувати проникність тканин, що сприяє розповсюдженню речовин, які надходять разом з ним (Kajstura et al., 1998), тому при дезагрегації її використовують у поєднанні з іншими ферментами. Колагеназа здатна розщеплювати колаген, який є найбільш розповсюдженим білком позаклітинного матриксу в організмі ссавців (не винятком є і серце, у якому в нормі виявляють декілька типів колагену) (Silver et al., 1983).

На даний час існує ряд розрізнених даних щодо впливу ферментів на серцеву тканину за її дезагрегації. Так, за даними Mireille Masson-Pévet та ін.

(Messina et al., 2016) вплив трипсину на клітини серця призводить до значного їх пошкодження, тоді як за впливу колагенази – пошкоджень клітин не відмічали. De Bruijne J. та ін. (Gross et al., 1968; de Bruijne and Jongsma, 1980), повідомляють, що мембранні властивості клітин серця, оброблених колагеназою, відповідають таким у інтактних клітинах. Разом з тим, Colizza D. та ін. (Colizza et al., 1983) у своїх дослідженнях демонструють протилежні результати: клітини, що піддавалися дії трипсину, більш подібні до інтактних клітин, ніж ті, що піддавалися дії колагенази. Speicher, D.W. та ін. (Speicher and McCarl, 1974) пояснюють це тим, що вивільнення клітин без їх пошкодження з тканин можливе лише при правильно підбраній концентрації трипсину з урахуванням ступеня його очистки.

Зважаючи на вищесказане, ферментативну обробку тканин серця kota комбінацією 2,5% трипсину з додаванням 0,5 мг/мл колагенази (тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази з експозицією 12 годин при температурі 4 °C можна вважати оптимальним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда котів. При цьому комплексний вплив ферментів та тривала експозиція за низької температури дозволили розщепити міжклітинні зв'язки та мінімізувати негативний вплив на клітини, які в подальшому були здатні до проліферації.

Висновки

Найбільш ефективним методом отримання культури стовбурових клітин міокарда котів є використання комбінації ферментів: 2,5% трипсину, 0,5 мг/мл колагенази (тип II) та 0,5 мг/мл гіалуронідази, що дозволяє з 10 мг тканин серця отримати $986,0 \pm 9,3$ тис. клітин, здатних до проліферації. Найменш ефективним виявився метод експланту (без використання ферментів), оскільки кількість прикріплених до культурального пластику клітин за його використання на 5 добу культивування складала $35,7 \pm 6,2$ тис.

Перспективи подальших досліджень: проведені дослідження щодо визначення оптимального методу отримання культури стовбурових клітин міокарда котів дасть можливість апробувати даний підхід при отриманні культури стовбурових клітин з інших органів.

References

- Masurkewitsch, A.J., Kowpak, V.V. & Danilow, V.B. (2014). Klitynni technologii u weterinarniy medyzyni. Nawtschal'nyi posibnyk. [Cellular technologies in veterinary medicine. Manual]. Kyev: KOMPRINT (in Ukrainian).
- Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C.A., & Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, 344(23), 1750–1757. doi: 10.1056/NEJM200106073442303.
- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R. W., Lecapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A. P., D'Alessandro, D. A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R. E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A. & Anversa, P. (2007). Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(35), 14068–14073. doi: 10.1073/pnas.0706760104.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., & Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6), 763–776. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00687-1.
- Colizza, D., Guevara, M.R., & Shrier, A. (1983). A comparative study of collagenase- and trypsin-dissociated embryonic heart cells: reaggregation electrophysiology, and pharmacology. *Can J Physiol Pharmacol*, 61(4), 408–419. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6305468>.
- de Bruijne, J., & Jongsma, H.J. (1980). Membrane properties of aggregate of collagenase-dissociated rat heart cells. *Adv Myocardiol*, 1, 231–242. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248936>.
- Gross, W.O., Schöpf-Ebner, E., & Bucher, O.M. (1968). Technique for the preparation of homogeneous cultures of isolated heart muscle cells. *Exp Cell Res*, 53(1), 1–10.
- Hynes, W.L., & Walton, S.L. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 183(2), 201–207. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08958.x.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato N., DiLoreto C., Beltrami, C.A., & Anversa, P. (1998). Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(15), 8801–8805. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC21157>.
- Olsen, J.V., Ong S.E., & Mann, M. (2004). Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues *Molecular & Cellular Proteomics*, 3 (6), 608–614. doi: 10.1074/mcp.T400003-MCP200.
- Lee, J.H., Ha, J.M., & Leem, C.H. (2015). A Novel Nicotinamide Adenine Dinucleotide Correction Method for Mitochondrial Ca(2+) Measurement with FURA-2-FF in Single Permeabilized Ventricular Myocytes of Rat. *Korean J Physiol Pharmacol*, 19(4), 373–382. doi: 10.4196/kjpp.2015.19.4.373.
- Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L.E., Berman, D., Czer, L.S., Marbán, L., Mendizabal, A., Johnston, P.V., Russell, S.D., Schuleri, K.H., Lardo, A.C., Gerstenblith, G. & Marbán, E. (2012). Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*, 379(9819), 895–904. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60195-0.
- Masson-Pévet, M., Jongsma, H.J., & de Bruijne, J. (1976). Collagenase- and trypsin-dissociated heart cells: A comparative ultrastructural study. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 8(10), 747–757 doi: 10.1016/0022-2828(76)90082-1.
- Messina, L., Gavira, J.A., Pernagallo, S., Unciti-Broceta, J.D., Sanchez Martin, R.M., Diaz-Mochon, J.J., Vaccaro, S., Conejero-Muriel, M., Pineda-Molina, E., Ca-

- ruso, S., Musumeci, L., Di Pasquale, R., Pontillo, A., Sincinelli, F., Pavan, M., & Secchieri, C. (2016). Identification and characterization of a bacterial hyaluronidase and its production in recombinant form. *FEBS Lett*, 590(14), 2180–2189. doi: 10.1002/1873-3468.12258.
- Mukherjee, R., Multani, M.M., Sample, J.A., Dowdy, K.B., Zellner, J.L., Hoover, D.B., & Spinale, F.G. (2002). Effects of adrenomedullin on human myocyte contractile function and beta-adrenergic response. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 7(4), 235–240. doi: 10.1177/107424840200700406.
- Sharma, S., Mishra, R., Simpson, D., Wehman, B., Colletti, E. J., Deshmukh, S., Datla, S. R., Balachandran, K., Guo, Y., Chen, L., Siddiqui, O. T., Kaushal, S. & Kaushal, S. (2015). Cardiosphere-derived cells from pediatric end-stage heart failure patients have enhanced functional activity due to the heat shock response regulating the secretome. *Stem Cells*, 33(4), 1213–1229. doi: 10.1002/stem.1937.
- Shoulders, M.D., & Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929–958. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.032207.120833.
- Silver, L.H., Hemwall, E.L., Marino, T.A., & Houser, S.R. (1983). Isolation and morphology of calcium-tolerant feline ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 245 (5 Pt 1), H891-6. doi: 10.1152/ajpheart.1983.245.5.H891.
- Speicher, D.W. & McCarl, R.L. (1974). Pancreatic enzyme requirements for the dissociation of rat hearts for culture. *In Vitro*, 10(1–2), 30–41. doi: 10.1007/BF02615336.
- Zhang, D., Wu, C.T., Qi, X., Meijering, R.A., Hoogstra-Berends, F., Tadevosyan, A., Cubukcuoglu Deniz, G., Durdu, S., Akar, A.R., Sibon, O.C., Nattel, S., Henning, R.H., & Brundel, B.J. (2014). Activation of histone deacetylase-6 induces contractile dysfunction through derailment of α -tubulin proteostasis in experimental and human atrial fibrillation. *Circulation*, 129(3), 346–358. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005300.