

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 611.731.1;591.862

Т. Ю. Зырянова, А. Г. Марков

ЭКСПРЕССИЯ CD97 В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКНАХ ЧЕЛОВЕКА

Введение

CD97 представляет собой белковую молекулу, которая является членом семейства трансмембранных рецепторов эпидермальных факторов роста (ЭФР) адгезионного класса, сопряженных с G-белками [1, 2]. Особенностью строения CD97 является наличие большого внеклеточного N-концевого участка молекулы (α -спирали), за счет которого данный рецептор способен связываться с различными лигандами. В состав экстраклеточного участка входят специфичные ЭФР-подобные домены, связывающиеся с эпидермальными факторами роста. Количество и состав этих доменов, а следовательно, изоформы CD97 определяются альтернативным сплайсингом матричной РНК [3, 4].

CD97 экспрессируется в различных тканях, где его функция достаточно хорошо изучена. Впервые CD97 был обнаружен на поверхности лимфоцитов в 1994 г. [5]. Считается, что CD97 экспрессируется во всех типах лейкоцитов, причем наибольший уровень экспрессии обнаружен в миелоидных клетках [6]. Было показано, что на первых этапах CD97 участвует в миграции лейкоцитов через стенки кровеносных сосудов к очагу воспаления, связываясь с лигандом CD55 и тем самым активируя макрофаги [7]. Кроме того, было выявлено, что CD97 также экспрессируется в эпителиальных клетках злокачественных опухолей щитовидной железы и желудочно-кишечного тракта [8]. Интенсивность экспрессии была различной на разных этапах дифференцировки клеток [9]. Также было показано, что CD97 экспрессируется с неодинаковой интенсивностью в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов мочевого пузыря, бронхиолах легких, миометрии и желудочно-кишечного тракта [10]. Относительно экспрессии этой молекулы в скелетных мышцах данные отсутствуют.

Целью данного исследования было изучение интенсивности экспрессии CD97 в быстрых и медленных скелетных мышечных волокнах человека.

Материалы и методы исследования

Методические особенности получения материала. Исследован биопсийный материал нескольких видов спинной мышцы *m. spinalis* на уровне первого позвонка поясничного отдела позвоночника (*L1, lumbar spine*). Мышечная ткань была получена от пациентов ($n=6$) в результате реконструктивных операций в отделении хирургии

и травматологии университетской клиники Лейпцига (Германия). Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Медицинского факультета Университета Лейпцига (N 111–2004) и проведено с личного согласия пациентов.

В работе использовался материал, удаленный от пациентов в возрасте от 4 до 80 лет, не страдающих различными генетическими заболеваниями, в том числе фармакогенетическим дефектом скелетных мышц — злокачественной гипертермией. Все пациенты были здоровы по стандартным медицинским показателям.

После оперативного вмешательства полученные образцы немедленно замораживали в жидком азоте для последующих экспериментов.

Иммуногистохимическое окрашивание. Иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартной методике [10, 11]. Замороженные срезы (6 мкм) фиксировали в охлажденном ацетоне или в 4%-ном растворе параформальдегида (Aldrich, Германия) в течение 10 мин в зависимости от используемых антител. Далее образцы инкубировали в 0,03% H_2O_2 для уменьшения внутренней активности пероксидазы при комнатной температуре. Для блокирования неспецифического связывания срезы инкубировали 60 мин в лошадиной сыворотке при комнатной температуре (ImmPRESS™ Detection system, Vector Laboratories, США).

В течение ночи (4°C) срезы инкубировали с раствором первичных моноклональных мышечных антител. Раствор вторичных антител наносили на 30 мин. Все этапы отмывания ткани осуществляли с помощью фосфатного буфера (PBS) с Ca^{2+} и Mg^{2+} (PAA Laboratories GmbH, Германия). Для визуализации окраски срезов ткани использовали 3,3-диаминобензидин (ДАБ).

Используемые антитела. Для определения процента быстрых и медленных мышечных волокон каждой мышцы применяли первичные моноклональные мышечные антитела к тяжелой цепи миозина быстрой (клон WB-MHC fast) и медленной формы (клон WB-MHC slow) (Vector Laboratories, США). Для определения локализации CD97 в быстрых и медленных мышечных волокнах использовали первичные моноклональные мышечные антитела (иммуноглобулин G1) к стеблевой части α -цепи CD97 клона MEM-180 (V. Horesti, ExBio, Hiss Diagnostics, Чехия) [12]. Для визуализации первичных антител наносили вторичные моноклональные антитела (Vector Laboratories, США), использовали антимышиный иммуноглобулин G (ImmPRESS™ Detection system, США).

Имунофлуоресцентное окрашивание. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили по стандартной методике [10, 11]. В течение ночи (4°C) срезы инкубировали с раствором первичных моноклональных мышечных антител. Раствор вторичных антител наносили на 60 мин.

Используемые антитела. В качестве первичных антител использовали иммуноглобулины, описанные выше в иммуногистохимической методике. В качестве вторичных антител применяли моноклональные антитела (Molecular Probes, Германия): Alexa Fluor 546 Cy3 козий антимышиный иммуноглобулин G и Alexa Fluor™488 куриный антимышиный иммуноглобулин G.

Сканирующая конфокальная микроскопия. Препараты изучали и фотографировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM5 Pascal (Carl Zeiss, Германия) в исследовательской лаборатории отделения хирургии и травматологии Медицинского факультета Университета Лейпцига, используя 10- и 40-кратное увеличение и возбуждающую длину волны 488 и 546. Эмиссия Alexa Fluor™488 происходила в зеленой области спектра, эмиссия Alexa Fluor 546 Cy3 — в красной.

Данные по конфокальной микроскопии обрабатывали с помощью программного обеспечения AxioVision 4.8 (Carl Zeiss Imaging Systems, Германия).

Определение степени экспрессии белка. Степень экспрессии белка определяли с помощью визуального анализа интенсивности флуоресценции после получения серии фотографий. Все фотографии были сделаны в сходных условиях без изменения технических параметров установки и программного обеспечения. На последовательных окрашенных разными антителами срезах мышечной ткани человека выбирали одинаковый участок образца для анализа при равном увеличении микроскопа во всех случаях. На каждом участке образца было проанализировано в среднем 60 волокон. На каждом срезе у всех пациентов без исключения выбирали 3–4 участка для анализа. Таким образом, всего было проанализировано 1267 волокон от шести пациентов.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Методы описательной (дискретной) статистики включали в себя оценку среднего арифметического (M), средней ошибки (m), а также частоты встречаемости признаков (с дискретными значениями). Для оценки межгрупповых различий применяли t -критерий Стьюдента и U -критерий Манна-Уитни.

Статистическая обработка материала выполнялась с использованием стандартных пакетов программ прикладного статистического анализа GraphPad Prism version 5.0 (Graph Pad Software, США). Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы (об отсутствии значимых различий между выборками) принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Локализация CD97 в мышечных волокнах разного типа. Показано, что CD97 локализован и в быстрых, и в медленных волокнах (таблица). Как видно из таблицы, процент медленных волокон, экспрессирующих CD97 в спинных мышцах составлял $67 \pm 4\%$, а в быстрых — $32 \pm 4\%$. Кроме того, было показано, что антитела к быстрым и медленным волокнам визуализируются в одних и тех же клетках (обнаружено $1 \pm 0,5\%$ подобных клеток). Данный фенотип определен впервые и обозначен, как промежуточный. Волокна промежуточного типа были также CD97 иммуноположительны.

Интенсивность экспрессии CD97 в быстрых и медленных волокнах. С помощью качественного метода иммуногистохимического окрашивания удалось установить тенденцию локализации CD97 в волокнах разного типа. Было показано, что CD97 в основном локализован в медленных волокнах (рис. 1). Однако данного описательного метода было не достаточно, чтобы оценить экспрессию изучаемой молекулы количественно. В качестве количественного подхода применяли метод иммунофлуоресцентного окрашивания с анализом изображений на сканирующем конфокальном микроскопе.

При неизменных технических параметрах определения интенсивности свечения было отмечено, что интенсивность свечения CD97 в быстрых и медленных волокнах отличается. Можно выделить 2 типа волокон: сильно и слабо иммуноположительные по CD97. К первому типу отнесли волокна, у которых наблюдалось яркое свечение в цитоплазме, а также на границах клеток — плазмалемме. Эти волокна были определены нами, как CD97 сильно иммуноположительные. При применении количественного подсчета мы рассматривали именно их. В данном случае количество таких волокон

Таблица 1. Процент CD97 иммуноположительных быстрых и медленных волокон *m. spinalis* человека

Пациент №	Количество проанализированных волокон (n)	% CD97+ медленных волокон	% CD97+ быстрых волокон	% CD97+ волокон промежуточного типа
1	307	53	45	2
2	129	64	33	3
3	231	68	31	1
4	238	74	26	0
5	256	55	45	0
6	106	86	14	0
<i>M ± m</i>		67 ± 4	32 ± 4	$1 \pm 0,5$

Примечание. CD97+ — иммуноположительные волокна. Количество всех CD97 иммуноположительных волокон было принято за 100%.

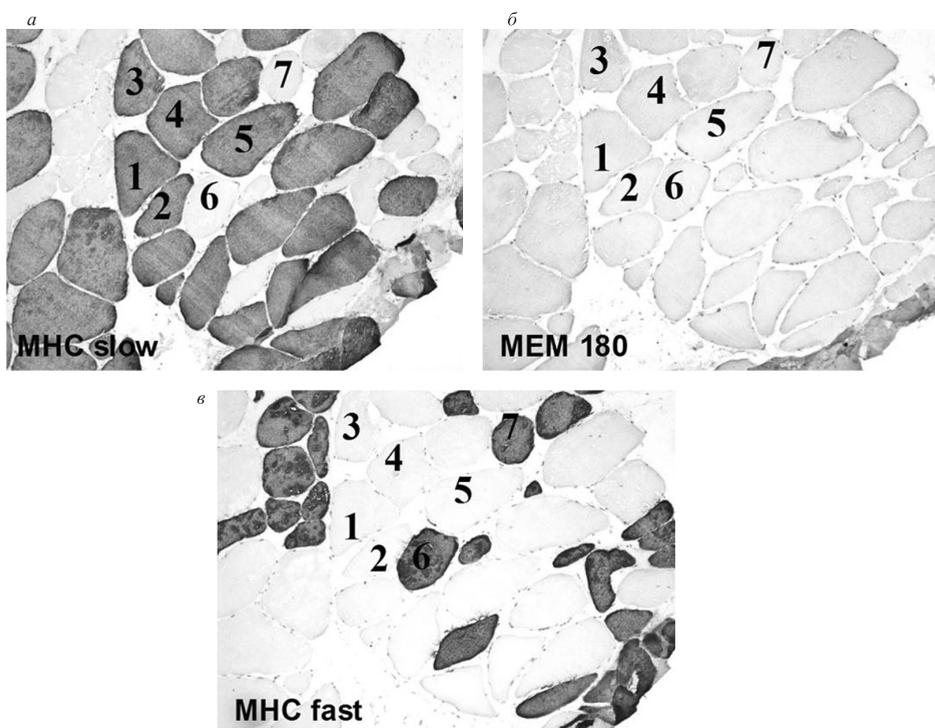


Рис. 1. Иммуногистохимическое изображение срезов спинных мышц человека на сканирующем конфокальном микроскопе при 10-кратном увеличении

a — изображение иммуноположительных волокон, окрашенных антителами к медленной форме тяжелой цепи миозина (медленные волокна), *б* — изображение CD97 иммуноположительных волокон, окрашенных антителами к CD97 (клон антител MEM 180), *в* — изображение иммуноположительных волокон, окрашенных антителами к быстрой форме тяжелой цепи миозина (быстрые волокна). Цифры 1–5 обозначают, что CD97 экспрессируется в волокнах медленного типа; 6, 7 обозначают, что CD97 экспрессируется в волокнах быстрого типа.

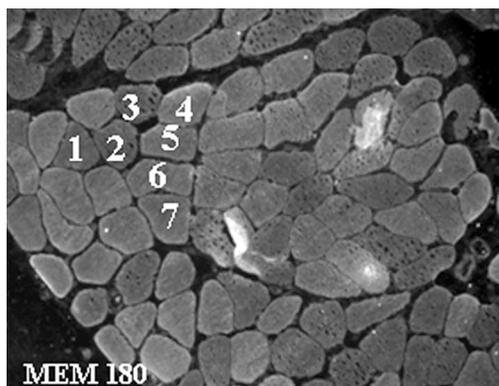


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное изображение среза спинных мышц человека, окрашенных антителами к CD97 (клон MEM 180) на сканирующем конфокальном микроскопе при 10-кратном увеличении

Цифры 1–3 обозначают CD97 слабо иммуноположительные волокна; 4–7 — CD97 сильно иммуноположительные волокна (при использовании количественного подхода именно их принимали за 100%).

принимали за 100%. Ко второму типу волокон отнесли клетки со слабым флуоресцентным свечением как цитоплазмы, так и мембраны. При использовании количественного подхода этот тип волокон не подсчитывали (рис. 2).

Было выявлено, что процент CD97 сильно иммуноположительных медленных волокон был достоверно выше, чем процент CD97 сильно иммуноположительных быстрых волокон (91 ± 4 и $8 \pm 4\%$, соответственно). Процент CD97 сильно иммуноположительных волокон промежуточного типа составил $1 \pm 0,8$ (рис. 3, 4).

Таким образом, результаты исследования показали, что CD97 присутствует во всех мышечных волокнах спинных мышц человека, однако интенсивность этой экспрессии различна. Кроме того, выявлено, что более сильная экспрессия CD97 происходит преимущественно в медленных волокнах. Однако конкретная функция этой молекулы в скелетных мышцах в данный момент неизвестна.

Предполагаем, что более интенсивная экспрессия CD97 в медленных волокнах связана с тем, что в скелетных мышцах существуют разные изоформы данной молекулы [3, 4]. Используемые в работе антитела могут связываться, например, преимущественно с изоформами, характерными для медленных волокон.

Из литературных данных известно, что часть быстрых мышечных волокон может превращаться в медленные при длительной низкочастотной (10 Гц) стимуляции на протяжении нескольких дней [13]. Через 60 дней после начала эксперимента происходят изменения в синтезе тяжелой и легкой цепи миозина. Так, например, изоформа тяжелой цепи миозина типа IIa (МНСIIa), характерная для волокон быстрого типа, постепенно превращается в изоформу I (МНСI), характерную для медленных мышц [14]. Интересно было бы проанализировать экспрессию и колокализацию CD97 с указанными изоформами тяжелой цепи миозина на разных стадиях процесса превращения

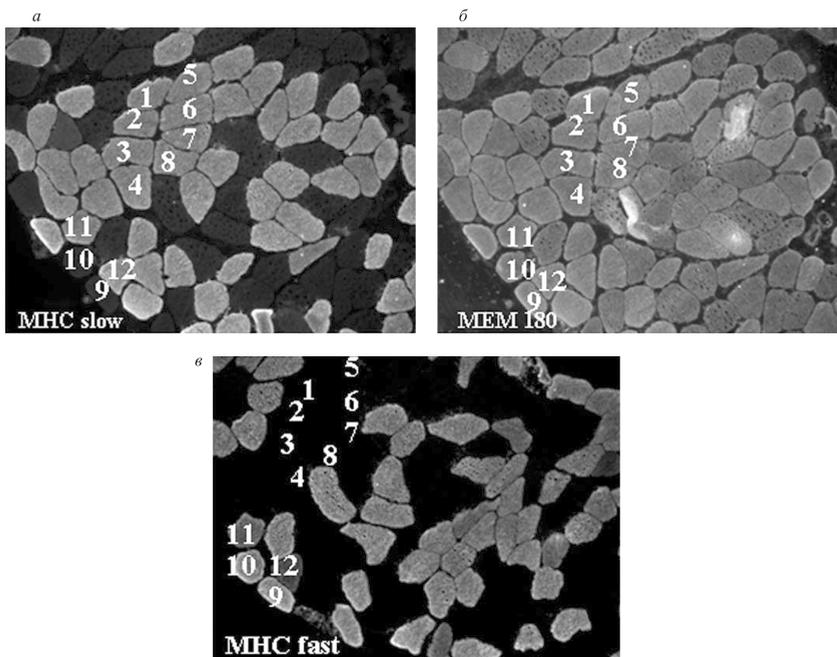


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное изображение срезов спинных мышц человека на сканирующем конфокальном микроскопе при 10-кратном увеличении:

a — изображение иммуноположительных волокон, окрашенных антителами к медленной форме тяжелой цепи миозина (медленные волокна); *б* — изображение CD97 иммуноположительных волокон, окрашенных антителами к CD97 (клон антител MEM 180); *в* — изображение иммуноположительных волокон, окрашенных антителами к быстрой форме тяжелой цепи миозина (быстрые волокна). Цифры 1–8 обозначают, что CD97 экспрессируется в медленных волокнах; 9–10 — в быстрых волокнах; 11–12 обозначают, что CD97 экспрессируется как в быстрых, так и в медленных волокнах (промежуточный тип волокон). Оценивали только CD97 сильно иммуноположительные волокна.

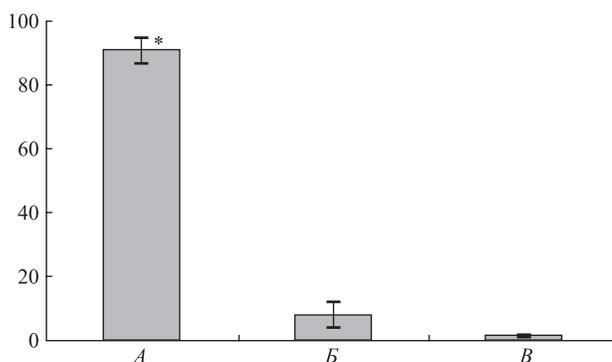


Рис. 4. Количество CD97 сильно иммуноположительных волокон медленного, быстрого и промежуточного типа в спинных мышцах человека:

По оси абсцисс: А — медленные; Б — быстрые; В — промежуточные волокна. По оси ординат: % CD97 сильно иммуноположительных волокон (клон MEM 180). * — достоверное различие между группами ($p < 0,05$).

быстрых мышечных волокон в медленные. Возможно, именно с этим процессом связана повышенная экспрессия CD97 в медленных мышечных волокнах.

Так как гладкие мышцы, в которых ранее была показана экспрессия CD97 [10], с точки зрения скорости сокращения являются медленными мышцами [15], то полученный нами экспериментальный материал подтверждает, что именно с медленными волокнами, вероятно, связана функциональная роль исследуемого рецептора.

Литература

1. The human EGF-TM7 family: a postgenomic view / M. J. Kwakkenbos, E. N. Kop, M. Stacey, M. Matmati, S. Gordon, H. H. Lin, J. Hamann // *Immunogenetics*. 2004. Vol. 55. P. 655–666.
2. Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors / S. Yona, H. H. Lin, W. O. Siu, S. Gordon, M. Stacey // *Trends Biochem. Sci.* 2008. Vol. 33. P. 491–500.
3. CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation / J. X. Gray, M. Haino, M. J. Roth, J. E. Maguire, P. N. Jensen, A. Yarme, M. A. Stetler-Stevenson, U. Siebenlis, K. Kelly // *J. Immunol.* 1996. Vol. 157. P. 5438–5447.
4. Molecular cloning and characterization of mouse CD97 / J. Hamann, van C. Zeventer, A. Bijl, C. Molenaar, K. Tesselaar, van R. A. Lier // *Int. Immunol.* 2000. Vol. 12. P. 439–448.
5. Eichler W., Aust G., Hamann D. Characterization of the early activation-dependent antigen on lymphocytes defined by the monoclonal antibody BL-Ac(F2) // *Scand. J. Immunol.* 1994. Vol. 39. P. 111–115.
6. Differential expression of CD97 on human lymphocyte subsets and limited effect of CD97 antibodies on allogeneic T-cell stimulation / E. N. Kop, M. Matmati, W. Pouwels, G. Leclercq, P. P. Tak, J. Hamann // *Immunol. Lett.* 2009. Vol. 123. P. 160–168.
7. Identification of the epidermal growth factor-TM7 receptor EMR2 and its ligand dermatan sulfate in rheumatoid synovial tissue / E. N. Kop, M. J. Kwakkenbos, G. J. Teske, M. C. Kraan, T. J. Smeets, M. Stacey, H. H. Lin, P. P. Tak, J. Hamann // *Arthritis Rheum.* 2005. Vol. 52. P. 442–450.
8. Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor / L. H. Jaspars, W. Vos, G. Aust, van R. A. Lier, J. Hamann // *Tissue Antigens*. 2001. Vol. 57. P. 325–331.
9. CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas / G. Aust, W. Eichler, S. Laue, I. Lehmann, N. E. Heldin, O. Lotz, W. A. Scherbaum, H. Dralle, C. Hoang-Vu // *Cancer Res.* 1997. Vol. 57. P. 1798–1806.
10. Diversity of CD97 in smooth muscle cells (SMCs) / G. Aust, E. Wandel, C. Boltze, D. Sittig, A. Schütz, L. C. Horn, M. Wobus // *Cell Tissue Res.* 2006. Vol. 323. P. 1–9.
11. Expression and regulation of CD97 in colorectal carcinoma cell lines and tumor tissues / M. Steinert, M. Wobus, C. Boltze, A. Schütz, M. Wahlbuhl, J. Hamann, G. Aust // *Am. J. Pathol.* 2002. Vol. 161. P. 1657–1667.
12. Leucocyte typing VI: white cell differentiation antigens / J. Hamann, W. Eichler, B. Vogel, C. Stortelers, D. Hamann, V. Horejsi, R. A. van Lier // *CD97 workshop panel report*. New York: Garland Publishing. 1997. P. 527–529.
13. Hicks A., Ohlendieck K., Göpel S. O., Pette D. Early functional and biochemical adaptations to low-frequency stimulation of rabbit fast-twitch muscle // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 273 (1). Pt. 1. P. 297–305.
14. Leeuw T., Pette D. Coordinate changes of myosin light and heavy chain isoforms during forced fiber type transitions in rabbit muscle // *Dev. Genet.* 1996. Vol. 19(2). P. 163–168.
15. Canepari M., Pellegrino M. A., D'Antona G., Bottinelli G. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying // *Mechanisms Acta Physiol.* 2010. Vol. 199. P. 465–476.

Статья поступила в редакцию 15 декабря 2011 г.