

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ АПОПТОЗА В НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫХ ЦЕНТРАХ HER2/NEU МЫШЕЙ В ОНТОГЕНЕЗЕ С ПОМОЩЬЮ ДВУХ НЕЗАВИСИМЫХ МЕТОДОВ

<sup>1</sup>Бажанова Е.Д., <sup>2</sup>Степанова И.А., <sup>2</sup>Макарова К.А., <sup>1</sup>Белостоцкая Г.Б.,  
<sup>3</sup>Попович И.Г.

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург

<sup>2</sup>Российский Государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, г. Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова Росзсздрава, г. Санкт-Петербург

<sup>1</sup>Бажанова Е.Д.  
<sup>2</sup>Степанова И.А.  
<sup>2</sup>Макарова К.А.  
<sup>1</sup>Белостоцкая Г.Б.  
<sup>3</sup>Попович И.Г.  
<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН  
<sup>2</sup>Российский Государственный педагогический университет им. А.И. Герцена  
<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова Росзсздрава

Как известно, HER2/neu (ErbB2) – это онкопротеин, принадлежащий к семейству трансмембранных тирозинкиназных рецепторов. Это семейство состоит из 4 членов. Все белки ErbB в норме экспрессируются в эпителиальной, мезенхимальной и нервной тканях, где они играют важную роль в онтогенезе. Так, HER2 рецепторы стимулируют клеточный рост и пролиферацию, предупреждает апоптоз и, таким образом, сверхэкспрессия her2 может способствовать канцерогенезу. Для выявления предполагаемой связи процессов апоптоза и старения мы использовали ускоренно стареющих мышей со сверхэкспрессией her2 (2; 11 мес.), wild type (SHR) (2; 18 мес.). На срезах гипоталамической области мозга, содержащих супраоптическое (СОЯ) и паравентрикулярное (ПВЯ) ядра, был проведен подсчет количества апоптотических клеток с помощью двух независимых методов.

С помощью TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) можно идентифицировать апоптотические клетки, используя терминальную дезоксирибонуклеотидил-трансферазу для выявления разрывов ДНК. Были получены абсолютные значения (подсчитывалось количество темноокрашенных (рис. 1b) апоптотических клеток на гипоталамический центр, взятое как среднее на один срез) – Рис. 1а. Для сравнения, уровень апоптоза был определен с помощью люминесцентной микроскопии на срезах, окрашенных бромидом этидия (бромид этидия обладает способностью пассивно проникать в поврежденные ядра клеток, окрашивая поврежденную ДНК). При люминесцентной микроскопии подобные клетки (апоптотические) ярко светятся (рис. 2b). Подсчитывалась доля апоптотических клеток в процентах в каждом нейросекреторном центре (рис. 2а).

Для TUNEL использовали микроскоп Leica DM LS2 и микротеленасадку MTH-514, а для люминесцентной микроскопии микроскоп PFM (WPI, USA) и цифровую камеру LEICA DFC300 FX (Leica, Germany). Для подсчета количества апоптотических клеток в обоих случаях использовали компьютерную программу Видеотест Морфология, 4 (Россия). Применяли набор для TUNEL (Sileks, Россия) и бромид этидия (Sigma).

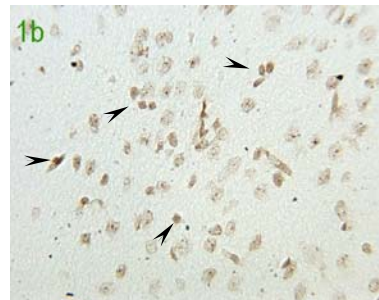
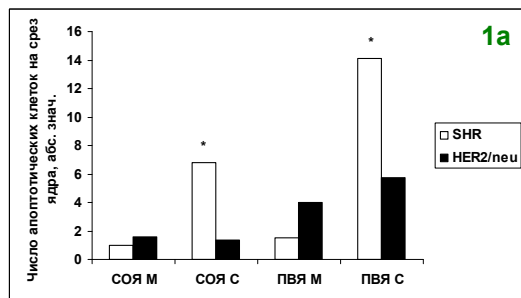
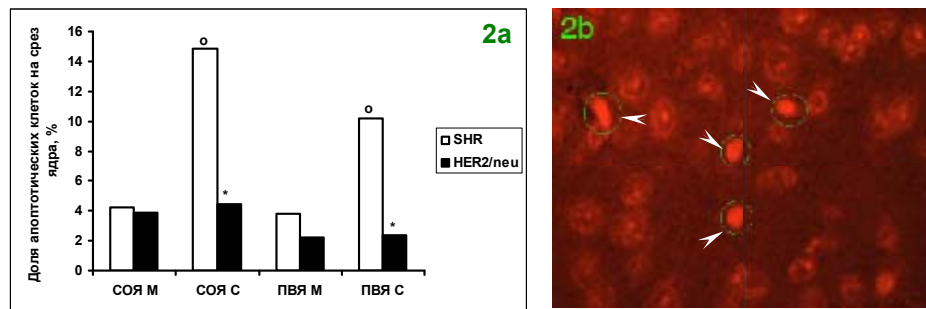


Рис.1. TUNEL-позитивные клетки в СОЯ и ПВЯ мышей SHR и HER2+/+.  
а) Число апоптотических клеток на срез ядер; б) Микрофотография ПВЯ С, об.х20. Стрелками отмечены примеры апоптотических клеток.

Обнаружены значительные различия в регуляции апоптоза между мышами дикого типа и трансгенными животными (рис. 1а; 2а М – молодые мыши, С – старые мыши). Уровень апоптоза повышался у старых мышей SHR в СОЯ и ПВЯ, тогда как не отмечалось возрастного повышения гибели нейросекреторных клеток (НСК) в гипоталамусе мышей *her2<sup>+/+</sup>*. Таким образом, можно заключить, что сверхэкспрессия *her2* активирует достаточно мощные механизмы, способные предупреждать апоптоз в СОЯ и ПВЯ при старении.



*Рис.2. Клетки, окрашенные бромидом этидия в СОЯ и ПВЯ мышей SHR и HER2<sup>+/+</sup>. а) Доля апоптотических клеток на срез ядер; б) Микрофотография ПВЯ С, об.х40. Стрелками отмечены апоптотические клетки.*

Сравнение методов показало, что не было принципиальных отличий между использованными методиками определения апоптоза на парафиновых срезах мозга (рис. 1а, 2а).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00032а).