

Медико-биологические проблемы жизнедеятельности

Научно-практический рецензируемый журнал

№ 2(12)

2014 г.

Учредитель

Государственное учреждение
«Республиканский научно-
практический центр
радиационной медицины
и экологии человека»

Журнал включен в:

- Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования диссертационных исследований по медицинской и биологической отраслям науки (31.12.2009, протокол 25/1)
- Перечень журналов и изданий ВАК Минобрнауки РФ (редакция май 2012г.)

Журнал зарегистрирован

Министерством информации
Республики Беларусь,
Свид. № 762 от 6.11.2009

Подписано в печать 26.09.14.
Формат 60×90/8. Бумага офсетная.
Гарнитура «Times New Roman».
Печать цифровая. Тираж 211 экз.
Усл. печ. л. 15. Уч.-изд. л. 14,3.
Зак. 1275.

Издатель ГУ «Республиканский
научно-практический центр
радиационной медицины и экологии
человека»
ЛИ № 02330/619 от 3.01.2007 г.
Продлена до 03.01.2017

Отпечатано в Филиале БОРБИЦ
РНИУП «Институт радиологии».
220112, г. Минск,
ул. Шпилевского, 59, помещение 7Н

ISSN 2074-2088

Главный редактор

А.В. Рожко (д.м.н., доцент)

Редакционная коллегия

В.С. Аверин (д.б.н., зам. гл. редактора), В.В. Аничкин (д.м.н., профессор), В.Н. Беляковский (д.м.н., профессор), Ю.В. Висенберг (к.б.н., отв. секретарь), Н.Г. Власова (д.б.н., доцент), А.В. Величко (к.м.н., доцент), В.В. Евсеенко (к.п.с.н.), С.А. Игумнов (д.м.н., профессор), А.В. Коротаяев (к.м.н.), А.Н. Лызииков (д.м.н., профессор), А.В. Макарович (к.м.н., доцент), С.Б. Мельнов (д.б.н., профессор), Э.А. Надыров (к.м.н., доцент), И.А. Новикова (д.м.н., профессор), Э.Н. Платошкин (к.м.н., доцент), Э.А. Повелица (к.м.н.), Ю.И. Рожко (к.м.н., доцент), М.Г. Русаленко (к.м.н.), А.Е. Силин (к.б.н.), А.Н. Стожаров (д.б.н., профессор), О.В. Черныш (к.м.н.), А.Н. Цуканов (к.м.н.), Н.И. Шевченко (к.б.н.)

Редакционный совет

В.И. Жарко (министр здравоохранения Республика Беларусь, Минск), А.В. Аклеев (д.м.н., профессор, Челябинск), С.С. Алексанин (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Д.А. Базыка (д.м.н., профессор, Киев), А.П. Бирюков (д.м.н., профессор, Москва), Л.А. Бокерия (д.м.н., академик РАН и РАМН, Москва), А.Ю. Бушманов (д.м.н., профессор, Москва), И.И. Дедов (д.м.н., академик РАМН, Москва), Ю.Е. Демидчик (д.м.н., член-корреспондент НАН РБ, Минск), М.П. Захарченко (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), Л.А. Ильин (д.м.н., академик РАМН, Москва), К.В. Котенко (д.м.н., профессор, Москва), В.Ю. Кравцов (д.б.н., профессор, Санкт-Петербург), Н.Г. Кручинский (д.м.н., Минск), Т.В. Мохорт (д.м.н., профессор, Минск), Д.Л. Пиневиц (Минск), В.Ю. Рыбников (д.м.н., профессор, Санкт-Петербург), В.П. Сытый (д.м.н., профессор, Минск), Н.Д. Тронько (д.м.н., профессор, Киев), В.П. Филонов (д.м.н., профессор), В.А. Филонюк (к.м.н., доцент, Минск), Р.А. Часнойть (к.э.н., Минск), В.Е. Шевчук (к.м.н., Минск)

Технический редактор

С.Н. Никонович

Адрес редакции

246040 г. Гомель, ул. Ильича, д. 290,
ГУ «РНИЦ РМ и ЭЧ», редакция журнала
тел (0232) 38-95-00, факс (0232) 37-80-97
<http://www.mbr.rcrm.by> e-mail: mbr@rcrm.by

© Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический
центр радиационной медицины и
экологии человека», 2014

№ 2(12)

2014

Medical and Biological Problems of Life Activity

Scientific and Practical Journal

Founder

Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

Journal registration
by the Ministry of information
of Republic of Belarus

Certificate № 762 of 6.11.2009

© Republican Research Centre
for Radiation Medicine
and Human Ecology

ISSN 2074-2088

Обзоры и проблемные статьи

- А.В. Рожко, А.А. Чешик**
Заболееваемость лейкозами у лиц, пострадавших в результате радиационных аварий (обзор литературы) 6

Медико-биологические проблемы

- А.П. Будина, А.С. Соловьев**
Роль опухолевого супрессора ARF в активации селективной аутофагии 14

- Е.Л. Есис, И.А. Наумов**
Динамика заболеваемости органов репродуктивной системы женщин, осуществляющих производственную деятельность в условиях химического производства 21

- В.Н. Мартинков, А.Е. Силин, Э.А. Надыров, И.Б. Тропашко, А.А. Силина, С.М. Мартыненко**
Анализ мутаций в кодирующей области гена BRCA1 у пациенток с раком молочной железы из Гомельской области Беларуси 27

- Е.В. Марцинкевич, Т.М. Лукашенко**
Возможность применения соевого молока для коррекции нарушений микробиоценоза толстого кишечника крыс, вызванных употреблением глутамата натрия 34

- А.А. Печёнкин, А.А. Лызиков, С.А. Новиковская, Л.А. Мартемьянова**
Ультраструктурные изменения пластических материалов при включении в артериальное русло 39

- А.Е. Филюстин, А.М. Юрковский, А.А. Гончар**
Особенности дистрофических изменений тел поясничных позвонков в зависимости от их функционального предназначения 50

- Л.А. Чунихин, Д.Н. Дроздов**
Относительная эффективность контрмер по критерию накопленной дозы внутреннего облучения 55

Reviews and problem articles

- A. Razhko, A. Cheshik**
The incidence of leukemia in patients affected as a result of radiation accidents (review of literature)

Medical-biological problems

- A.P. Budina, A.S. Soloviev**
The role of ARF tumor suppressor in activation of selective autophagy

- E.L. Esis, I.A. Naumov**
Dynamics of incidence of reproductive system organs in women carrying out productive activity in chemical production

- V.N. Martinkov, A.E. Silin, E.A. Nadyrov, I.B. Tropashko, A.A. Silina, S.M. Martynenko**
The mutation analysis of the coding region of the BRCA1 gene in patients with breast cancer from Gomel region of Belarus

- E.V. Martsynkevich, T.M. Lukashenko**
Use of soy milk correcting microbiocenosis colon of rats caused by the use of monosodium glutamate

- A.A. Pechenkin, A.A. Lyzikov, S.A. Novikovskaya, L.A. Martemyanova**
Ultrastructural changes in the bloodstream vessels with plastic material

- A.E. Filyustsin, A.M. Yurkovskiy, A.A. Gontchar**
Features of degenerative changes of vertebral bodies of lumbar spine depending on their functional mission

- L. Chunikhin, D. Drozdov**
Countermeasures related effectivity upon accumulated internal doses criteria

Клиническая медицина**Clinical medicine**

Н.Н. Климкович, В.В. Смольникова, О.В. Красько, Ж.Н. Пугачева

Тирозинкиназный рецептор FLT3 при первичных миелодиспластических синдромах

62

N. Klimkovich, V. Smolnikova, O. Krasko, Zh. Pugacheva

FLT3 receptor tyrosine kinase in de novo myelodysplastic syndrome

А.Н. Куриленко, Т.В. Бобр, Ю.И. Рожко

Опыт применения нутрицевтика «Лютакс Амд плюс» у пациентов с начальной стадией возрастной макулярной дегенерации

69

A. Kurilenko, T. Bobr, Yu. Razhko

Experience of application of nutraceutical «Lutax AMD plus» in patients with initial stage of age-related macular degeneration

А.В. Куроедов, Р.В. Авдеев, А.С. Александров, Н.А. Бакунина, А.С. Басинский, Е.А. Блюм, А.Ю. Брежнев, Е.Н. Волков, И.Р. Газизова, А.Б. Галимова, О.В. Гапонько, В.В. Гарькавенко, А.М. Гетманова, В.В. Городничий, М.С. Горшкова, А.А. Гусаревич, С.В. Диордийчук, Д.А. Дорофеев, С.А. Жаворонков, П.Ч. Завадский, О.Г. Зверева, У.Р. Каримов, А.В. Кулик, С.Н. Ланин, Дж.Н. Ловпаче, И.А. Лоскутов, Е.В. Молчанова, В.Ю. Огородникова, О.Н. Онуфрийчук, С.Ю. Петров, Ю.И. Рожко, Т.А. Сиденко
Первичная открытоугольная глаукома: в каком возрасте пациента и при какой длительности заболевания может наступить слепота

74

A.V. Kuroyedov, R.V. Avdeev, A.S. Alexandrov, N.A. Bakunina, A.S. Basinsky, E.A. Blyum, A.Yu. Brezhnev, E.N. Volkov, I.R. Gazizova, A.B. Galimova, O.V. Gaponko, V.V. Garkavenko, A.M. Getmanova, V.V. Gorodnichy, M.S. Gorshkova, A.A. Gusarevitch, S.V. Diordiychuk, D.A. Dorofeev, S.A. Zavoronkov, P.Ch. Zavadskiy, O.G. Zvereva, U.R. Karimov, A.V. Kulik, S.N. Lanin, Dzh.N. Lovpache, I.A. Loskutov, E.V. Molchanova, V.Yu. Ogorodnikova, O.N. Onufrichuk, S.Yu. Petrov, Yu.I. Razhko, T.A. Sidenko

Primary open-angle glaucoma: at what age and at what disease duration blindness can occur

О. С. Павлович, А. И. Розик, А.Г. Моренко
Электрическая активность коры головного мозга при восприятии акцентированных ритмических последовательностей и их мануальном воспроизведении у лиц с различным профилем асимметрии

85

O.S. Pavlovych, A.I. Rozik, A.G. Morenko

The electrical activity of the cerebral cortex in perception of accented rhythmic sequences and their manual reproduction in individuals with different profile asymmetry

Н.Н. Усова, Н.В. Галиновская, А.Н. Цуканов
Клинико-вегетативные взаимоотношения при инфаркте головного мозга

93

N.N. Usova, N.V. Halinouskaya, A.N. Tsukanov
Clinical vegetative interaction in cerebral infarction

И.Н. Мороз, Т.Г. Светлович

Анализ динамики показателей физического и психологического компонентов здоровья подопечных Службы сестер милосердия Белорусского общества Красного Креста при оказании медико-социальной помощи на дому

100

I. Moroz, T. Svetlovich

Analysis of the dynamics of the indicators of physical and psychological components of health of the beneficiaries of the Visiting Nurses Service of the Belarusian Red Cross in medical and social home care provision

М.Ю. Юркевич, Г.И. Иванчик, К.С. Комиссаров, М.М. Зафранская

Прогностическая значимость определения цитокинов у пациентов с идиопатической IgA-нефропатией

107

Обмен опытом

И.Р. Газизова, Р.М. Шафикова, А.А. Александров

Клинический случай лечения тяжелых офтальмологических осложнений синдрома Стивенса-Джонсона

113

Правила для авторов

118

M.Y. Yurkevich, H.I. Ivanchik, K.S. Komissarov, M.M. Zafranskaya

Prognostic significance of cytokines detection in idiopathic IgA-nephropathy

Experience exchange

I.R. Gazizova, R.M. Shafikova, A.A. Aleksandrov

Clinical case of treatment of heavy ophthalmic complications at Stevens-Johnson syndrome

РОЛЬ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА ARF В АКТИВАЦИИ СЕЛЕКТИВНОЙ АУТОФАГИИ

¹«Институт Вистар», г. Филадельфия, США

²ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия», г. Смоленск, Россия

Неуклонный рост частоты онкологических заболеваний диктует необходимость изучения молекулярных механизмов канцерогенеза и принципов работы опухолевых супрессоров. В данном исследовании была изучена роль опухолевого супрессора ARF в активации селективной деградации митохондрий (митофагии). В экспериментах на клетках остеосаркомы человека было показано, что повышение экспрессии ARF приводит к деполяризации мембран митохондрий и активации аутофагии, при которой поврежденные митохондрии целенаправленно доставляются в аутофагосомы и элиминируются в процессе митофагии. Одним из возможных механизмов активации ARF – опосредованной митофагии может быть взаимодействие ARF с белком-регулятором митофагии NIX.

Ключевые слова: аутофагия, митохондрии, митофагия, опухолевый супрессор, ARF

Введение

Опухолевый супрессор ARF (от английского Alternative Reading Frame) кодируется INK4a/ARF локусом, который находится на 9 хромосоме и подвергается мутациям в 40% опухолей человека [1, 3, 6]. Уровень ARF (белок p14 у человека и p19 у мышей) в нормальных клетках очень низок. Однако в ответ на активацию онкогенов, таких как *ras*, *myc*, E2F1, E1a, *v-Abl* и других, экспрессия ARF значительно увеличивается. Активированный ARF стабилизирует опухолевый супрессор p53, что приводит к остановке клеточного цикла и запрограммированной гибели клетки. В то же время ARF может действовать как опухолевый супрессор независимо от присутствия p53 в клетке и повышение его экспрессии в опухолевых клетках приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу даже при отсутствии в них опухолевого супрессора p53 [12]. Данные наблюдения привели к активному поиску механизмов, с помощью которых ARF подавляет канцерогенез. Было показано, что ARF взаимодействует в ядре с нуклеофосмином (B23), что сопровождается ингибированием синтеза и транспорта рРНК в цитоплазму, уменьшением количества зрелых рибосом

и приводит к нарушению роста опухолевых клеток [5,11]. Также было показано, что ARF регулирует транскрипцию таких онкогенов как *Myc*, E2F1 и DP1 путем непосредственного взаимодействия с ними. Данная функция ARF не зависит от статуса p53 в клетке [9].

Было установлено, что ARF локализуется в митохондриях и индуцирует неселективную аутофагию [2, 4]. В последние десятилетия, благодаря усовершенствованию технологических приемов, было доказано существование селективной аутофагии [13, 15], в том числе селективной деградации митохондрий (митофагии) [14]. Оказалось, что митофагия играет важное значение в жизни клеток как в нормальных условиях, так и при патологии [7, 8]. Однако молекулярные механизмы активации митофагии до конца не выяснены. В то же время изучение механизмов защиты клетки от дисфункции митохондрий позволит найти более эффективные пути борьбы с онкологическими и нейродегенеративными заболеваниями.

Целью исследования явилось изучение роли транскрипционного фактора ARF в процессе селективной деградации митохондрий.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили клетки остеосаркомы человека (U2OS) с внедренным в них вектором pcDNA 4/TO-ARF. Экспрессия гена ARF в данной клеточной линии контролируется присутствием в среде доксициклина. Культивирование клеток в присутствии 100 нг/мл доксициклина приводит к увеличению продукции ARF до уровня, сравнимого с количеством ARF в некоторых опухолях. Локализация транскрипционного фактора ARF в митохондриях подтверждалась выделением митохондриальной фракции из клеток остеосаркомы при помощи набора Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (PIERCE, США) и ее последующим анализом методом Вестерн блоттинга с использованием антител к ARF (Abcam, США), GRP75 и PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, США).

Изменения трансмембранного электрохимического потенциала митохондрий ($\Delta\psi$) выявляли методом проточной цитометрии с использованием красителя JC-1 (Guava Mitochondrial Depolarization Kit, Millipore, США). Этот катионный флуорохром встраивается в митохондрии и образует красные агрегаты с максимумом флуоресценции при длине волны 590 нм. Однако JC-1 способен изменять свои спектральные характеристики в зависимости от величины $\Delta\psi$. Регистрация подобных изменений в клетках остеосаркомы до и после индукции ARF осуществлялась на проточном цитометре производства Guava Technologies. В качестве положительного контроля деполяризации митохондрий использовался известный разобщитель окислительного фосфорилирования CCCP (Abcam, США) в концентрации 10 мкМ.

Способность ARF индуцировать аутофагию/митофагию изучалась после повышения экспрессии ARF следующими методами: 1) количественный анализ маркеров аутофагии и белков митохондрий проводили методом иммуноблоттинга по стандартной методике с использованием антител к белкам p62/SQSTM1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, США), LC3

(Novus Biologicals, США), актин (Sigma, США), p53 (Calbiochem, США) и белкам митохондрий BAK NT (Upstate, США) и NIX (Sigma, США); 2) методом иммуноцитофлюоресцентного анализа, в котором клетки выращивали на покровных стеклах размером 18×18 мм, помещенных в стерильные шестилуночные планшеты. Затем для визуализации аутофагосом, содержащих митохондрии, клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей маркер аутофагии белок LC3, меченный зелёной флуоресцентной меткой, и маркер митохондрий MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, США). Для микроскопии клеточные культуры фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 минут. Клетки на покровных стеклах переносили на предметное стекло. Полученные препараты анализировали с помощью конфокальной микроскопии, используя микроскоп Nikon E600. Последующая оценка количества окрашенных митохондрий проводилась с помощью программы ImageJ.

Существование ARF-NIX комплекса подтверждалось методом иммунопреципитации по ранее описанной методике с последующей детекцией преципитированных белков методом иммуноблоттинга [1].

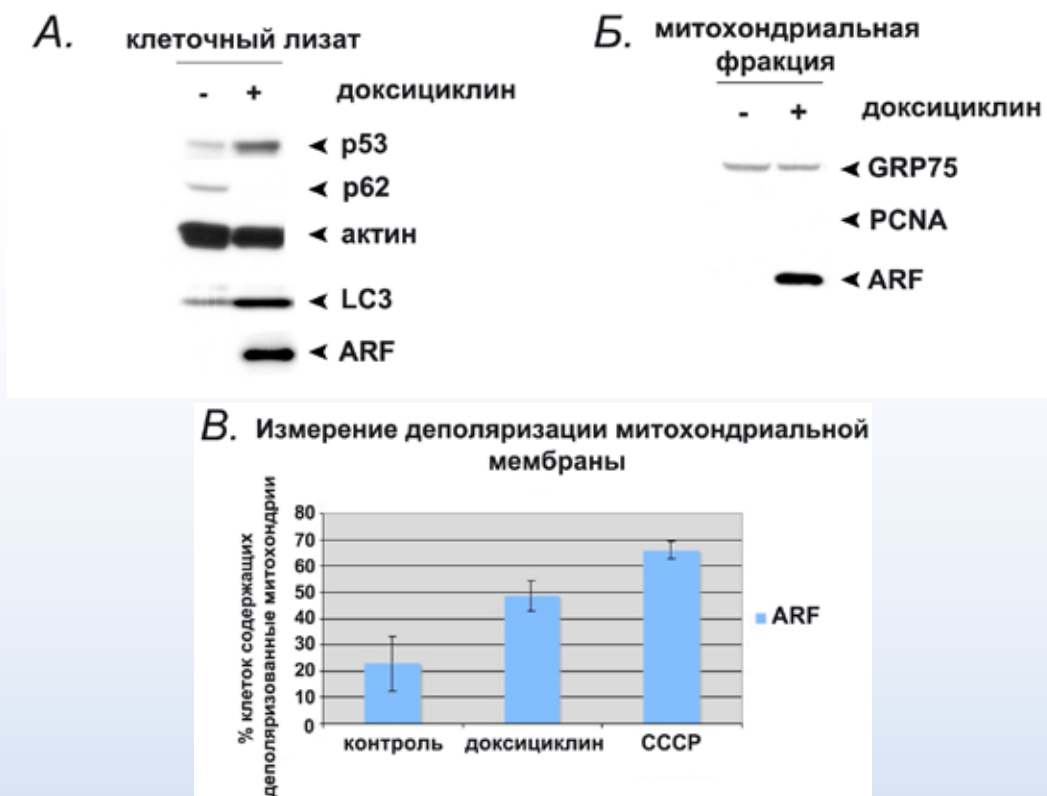
Для всех полученных результатов были подсчитаны средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Полученные данные обрабатывались статистически по t-критерию Стьюдента. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, а m – стандартная ошибка среднего. Значимыми считались различия при уровне значимости $p < 0,05$. В каждом случае проводили не менее 3 измерений. Построение графиков и диаграмм проводили в программе Microsoft Excel, на графиках указаны стандартные отклонения. Обработку изображений проводили в программе Adobe Photoshop 7.0.

Результаты исследования

Исследования показали, что увеличение экспрессии ARF в клетках остеосаркомы сопровождалось деградацией белка p62 (вхо-

дит в состав аутофагосомы и деградирует в процессе аутофагии) и накоплением расщепленной формы белка LC3, что свидетельствует об активации ARF-опосредованной аутофагии. Наблюдалось также повышение экспрессии p53 в результате индукции ARF, что соответствует хорошо изученной роли ARF по стабилизации опухолевого супрессора p53 (рисунок 1А). Для доказательства митохондриальной локализации белка ARF была выделена митохондриальная фракция из клеток остеосаркомы до и после индукции ARF. Вестерн блоттинг анализ показал, что часть белка ARF действительно локализуется в митохондриях (рисунок 1Б). Отсутствие в этой фракции цитоплазматического/ядерного белка PCNA и присутствие митохондриального белка GRP75 служили контролем чистоты митондрий в данном эксперименте.

Учитывая, что митохондриальный трансмембранный потенциал ($\Delta\psi_m$) тесно связан с функциональным состоянием митондрий в клетке, мы измерили $\Delta\psi_m$ в U2OS-ARF клетках с отсутствием либо повышенным уровнем опухолевого супрессора ARF. Кроме того, в качестве положительного контроля к данному эксперименту было проанализировано изменение $\Delta\psi_m$ в клетках остеосаркомы, инкубированных с протонофором CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), способным разобщать окислительное фосфорилирование путем повышения протонной проводимости через бислоиные участки мембраны. Проточный цитометрический анализ выявил, что повышение экспрессии ARF в клетке приводит к деполяризации митондрий до уровня, сравнимого с CCCP (рисунок 1В).



А – Вестерн блоттинг анализ клеточного лизата, полученного до и после активации ARF в U2OS-ARF клетках, достигнутой инкубацией их с доксициклином в течение 48 часов; Б - Вестерн блоттинг анализ содержания ARF в митохондриальной фракции клеток остеосаркомы после повышения экспрессии белка доксициклином; В – количественный анализ клеток содержащих деполяризованные митондрии в клетках U2OS-ARF с повышенной экспрессией ARF или после их инкубации с протонофором CCCP (в % по сравнению с контролем).

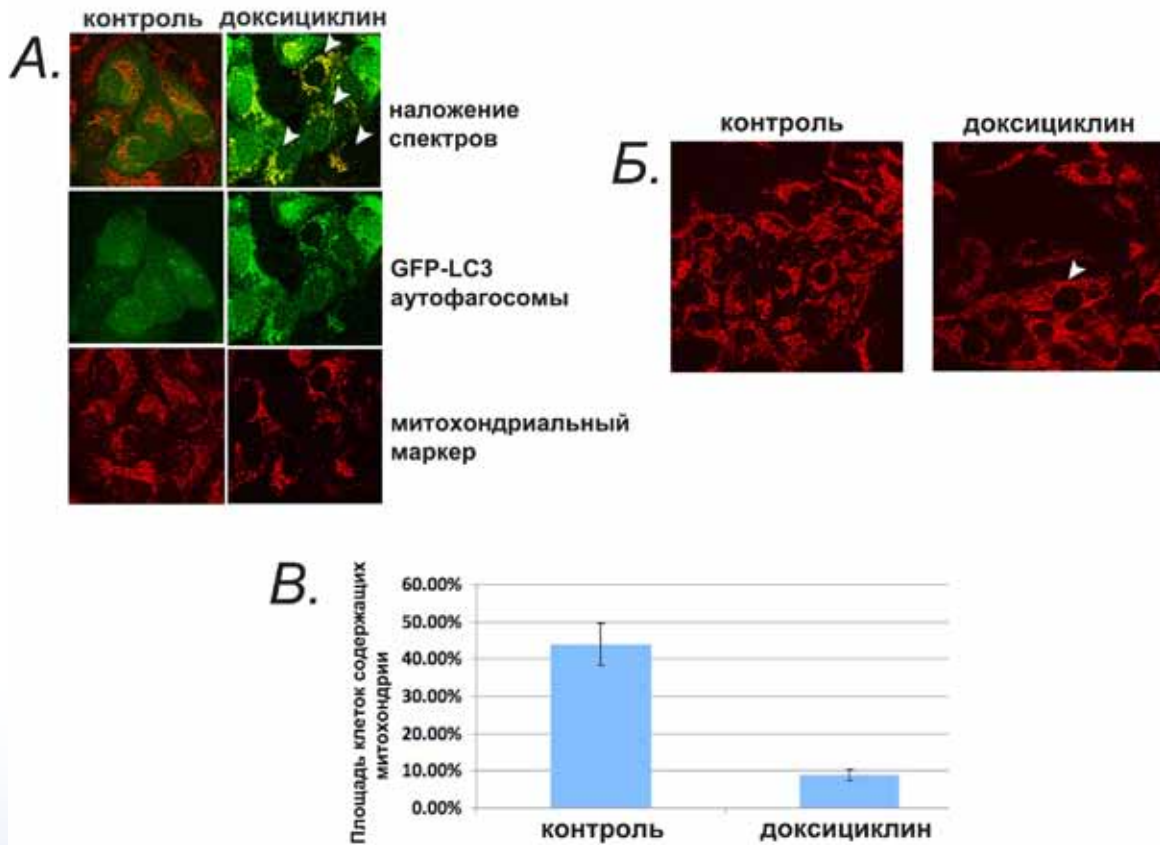
Рисунок 1 – Активация опухолевого супрессора ARF индуцирует неселективную аутофагию и деполяризацию мембран митондрий

Известно, что изменение мембранного потенциала митохондрий является ключевым звеном в запуске митохондриального пути каспазного каскада во время апоптоза. В то же время было показано, что ARF не активирует митохондриальный путь активации апоптоза [1]. Учитывая эти данные, можно предположить, что опухолевый супрессор ARF активирует селективную аутофагию митохондрий, с помощью которой клетки элиминируют поврежденные митохондрии. Для проверки данного предположения был использован метод изучения митофагии – исследование локализации аутофагосом с митохондриями с помощью конфокальной микроскопии. Активация деградации митохондрий сопровождается образованием аутофагосом, в которые доставляются поврежденные митохондрии. Таким образом, при использовании различных флуоресцентных меток для аутофагосом (например зеленой метки) и для митохондрий (например красной метки) можно наблюдать наложение спектров при активации митофагии (в данном случае наложение зеленого цвета на красный дало бы желтый цвет). Следуя данной методике, мы трансфецировали клетки U2OS-ARF двумя векторами: 1) вектором pDsRed-Mito, содержащим ген флуоресцентного белка DsRed слитый с сигналом локализации в митохондриях от эукариотической формы цитохром с-оксидазы; 2) вектором GFP-LC3, кодирующим белок аутофагосом LC3, меченный зеленой меткой GFP. Внедрение вектора pDsRed-Mito в клетки привело к флуоресцентному окрашиванию 100% митохондрий. Результаты конфокальной микроскопии полученной культуры показали, что в клетках с повышенным содержанием ARF маркер митохондрий Mito-DsRed локализован в тех же субклеточных компартаментах, что и зеленый белок аутофагосом GFP-LC3 (рисунок 2А, наложение спектров указано стрелками). Эти данные говорят об активации деградации митохондрий при экспрессии ARF. Для исследования влияния ARF – опосредованной аутофагии на количество митохондрий проводилось

культивирование клеток остеосаркомы с мечеными красным флуорохромом митохондриями в присутствии доксициклина в течении 48 часов. Изменение флуоресценции оценивали методом конфокальной микроскопии. Было найдено, что количество клеток, содержащих митохондрии было значительно меньше после индукции ARF по сравнению с контролем. Количественный анализ площади митохондрий показал, что в результате экспрессии ARF площадь клеток содержащих митохондрии уменьшилась в 5 раз (рисунок 2В). Митохондрии, не подвергшиеся деградации, формировали взаимосвязанную тубулярную сеть (рисунок 2Б, указано стрелкой). Можно предположить, что изменение морфологии митохондрий защищает их от митофагии так как, по-видимому, размер тубулярных органелл превышает размер аутофагосом.

Если ARF действительно активирует митофагию, то экспрессия ARF должна сопровождаться уменьшением уровня митохондриальных белков в клетке. Вестерн блоттинг анализ подтвердил, что активация ARF – опосредованной аутофагии в клетках остеосаркомы человека приводит к деградации белков митохондрий, таких как NIX, BAK NT и цитохром С (рисунок 3А). Полученные результаты свидетельствуют о селективном характере ARF – индуцированной аутофагии. Активация аутофагии в U2OS-ARF клетках подвергшихся голоданию, достигнутому инкубацией клеток с HBSS буфером, носила неселективный характер. При этом активация аутофагии не сопровождалась изменением уровня митохондриального белка BAK NT (рисунок 3Б).

Известно, что белки внешней митохондриальной мембраны BNIP3 и NIX/BNIP3L способствуют транспорту деполяризованных органелл в аутофагосомы путем непосредственного взаимодействия с белком аутофагосомальной мембраны LC3 [10]. Мы предположили, что одним из потенциальных механизмов активации ARF – опосредованной митофагии может быть взаимодействие ARF с белком-регулятором митофагии NIX. Наличие комплекса между



А и Б – иммуноцитофлуоресцентный анализ клеточной линии U2OS-ARF до и после активации ARF, достигнутой инкубацией клеток с доксициклином в течение 48 часов; В – таблица отражает количественный анализ площади клеток, содержащих меченные флуорохромом митохондрии в эксперименте.

Рисунок 2 – Опухолевый супрессор ARF активирует селективную деградацию митохондрий



А – Вестерн блоттинг анализ уровня митохондриальных белков BAK NT, NIX, цитохром С а также маркера аутофагии p62 до и после инкубации клеток остеосаркомы с доксициклином; Б – количественный анализ белка митохондрий BAK NT и маркера аутофагии p62 в U2OS-ARF клетках до и после индукции метаболического стресса буфером HBSS.

Рисунок 3 – ARF активирует деградацию белков митохондрий клеток остеосаркомы (U2OS-ARF)

этими белками было подтверждено методом иммунопреципитации (рисунок 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение экспрессии ARF, по-видимому, запускает NIX-зависимый путь деградации митохондрий.

Заключение

Полученные данные доказывают роль опухолевого супрессора ARF в активации селективной деградации митохондрий. Увеличение экспрессии ARF сопровождается деполяризацией мембран митохондрий с последующей активацией аутофагии, при которой поврежденные митохондрии целенаправленно доставляются в аутофагосомы и элиминируются в процессе митофагии. В этом процессе, по-видимому, важную роль играет взаимодействие между ARF и белком митохондрий NIX.

Библиографический список

1. Пимкина, Ю.С. Роль опухолевого супрессора ARF в канцерогенезе и молекулярных механизмах активации аутофагии: дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.16. – Санкт-Петербург, 2009. – 82 л.
2. Abida, W.M. p53-Dependent and p53-independent activation of autophagy by ARF / W.M. Abida, W. Gu. // *Cancer Res.* – 2008. – V. 68. – P. 352-357.
3. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest / D.E. Quelle [et al.] // *Cell.* – 1995. – V. 83. – P. 993-1000.
4. ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-x1 / J. Pimkina [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V.284. – P. 2803-2810.
5. ARF impedes NPM/B23 shuttling in an MDM2-sensitive tumor suppressor pathway / S.N. Brady [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V.24. – P. 9327-9338.
6. De Duve C. Functions of lysosomes / C. De Duve, R. Wattiaux // *Ann. Rev. Physiol.* – 1966. – V.28. – P. 435-492.
7. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1 / E.M. Va-

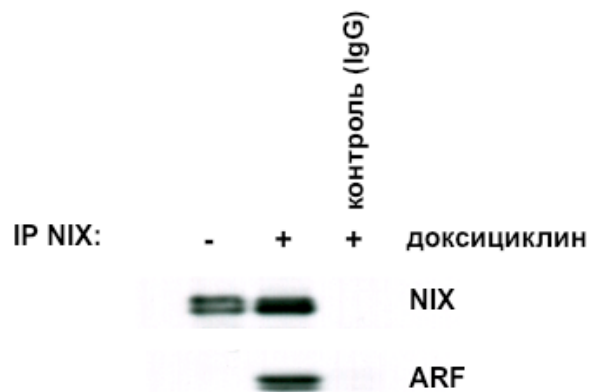


Рисунок 4 – Опухолевый супрессор ARF взаимодействует с митохондриальным белком NIX: реакция ко-иммунопреципитации белка ARF с белком NIX до и после инкубации клеток остеосаркомы с доксициклином в течение 24 часов

lente [et al.]. // *Science.* – 2004. – V.304. – P. 1158-1160.

8. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism / T. Kitada [et al.] // *Nature.* – 1998. – V.392. – P. 605-608.

9. Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc / A. Datta [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 352-357.

10. NIX is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance / I. Novak [et al.] // *EMBO reports.* – 2010. – V.11. – P. 45-51.

11. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export / Y. Yu [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V.26. – P. 3798-3809.

12. p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor / J.D. Weber [et al.] // *Genes. Dev.* – 2000. – V.14 – P. 2358-2365.

13. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway / Y.T. Zheng [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – V.183. – P. 5909-5916.

14. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes / S.P. Elmore [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – P. 2286-2287.

15. Tuttle, D.L. Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts / D.L. Tuttle, A.S. Lewin, W.A. Dunn // *Eur. J. Cell. Biol.* – 1993. – V.60. – P. 283-290.

A.P. Budina, A.S. Soloviev

**THE ROLE OF ARF TUMOR SUPPRESSOR IN
ACTIVATION OF SELECTIVE AUTOPHAGY**

Increasing cancer incidence creates the necessity to study molecular mechanisms of malignant transformation as well as molecular basis of tumor suppression by tumor suppressor genes. In this report we established the role of ARF tumor suppressor in activating selective degradation of mitochondria (mitophagy). Using osteosarcoma cell line, we showed that ARF overexpression leads to mitochondrial membrane depolarization and autophagy activation, in which damaged mitochondria are selectively delivered to autophagosomes for degradation by the process called mitophagy. One of the possible mechanisms of ARF-mediated mitophagy could be the interaction between ARF and a regulator of mitophagy NIX.

Key words: *autophagy, mitochondria, mitophagy, tumor suppressor, ARF*

Поступила 26.08.2014