

ӘОЖ 576.3.5.576.36.6

<sup>1</sup>Д. Әлімбетов\*, <sup>1</sup>Т. Нұрғожин, <sup>2</sup>Т. Дэйвис, <sup>2</sup>Д. Киплинг

<sup>1</sup>Өмір туралы Ғылымдар орталығы, Назарбаев Университеті, Қазақстан, Астана қ.  
<sup>2</sup>Генетика және Қатерлі ісік ауруы институты, Кардифф Университеті, Ұлыбритания  
\*e-mail: dauren.alimbetov@nu.edu.kz

### Жасушалардың қартаюуы нәтижесінде бөлінетін секреторлық фенотиптерді MSD платформасын қолдана отырып анықтау

Ғылыми жұмыста адам қартаюуының негізгі себептерінің бірі жасуша қартаюуы және оның әсерінен бөлінетін секреторлық фенотиптер жаңа технологияларды қолдана отырып зерттелді. Сонымен қатар, жұмыс барысында  $\beta$  – галактозидазаны (SA- $\beta$ -gal) қолдану арқылы адам жасушаларының қартаюу дәрежесі, 5-бром-2-дезоксинуридинмен индекстік маркерлеу (BrdU) әдісі арқылы жасушалардың бөлінуінің деңгейі бағаланды. Қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптің негізгі компоненттері MSD (Mesoscale discovery) жоғарғы өткізімдік жүйесін қолдану арқылы анықталды. Алынған нәтижелерге сүйене отырып MSD платформасы аталған фенотиптерді зерттеу мақсатында қолдануға болатын заманауи әдіс ретінде ұсынылды.

**Түйін сөздер:** жасуша қартаюуы, секреторлық фенотип, фибробласт, цитокиндер

D. Alimbetov, T. Nurgozhin, T. Davis, D. Kipling

#### Определение фенотипов ассоциированных со старением клеток с использованием MSD платформы

В данной научной работе были изучены секреторные фенотипы, ассоциированные со старением клеток с использованием современных технологий. Также в ходе исследования были оценены степень старения клеток методом старение-ассоциированной  $\beta$  – галактозидазы (SA- $\beta$ -gal) и деление клеток методом индексного маркирования с применением 5-бром-2-дезоксинуридина (BrdU). Основные компоненты секреторных фенотипов связанные со старением клеток были определены на высокопропускной системе MSD (Mesoscale discovery). В результате полученных данных MSD платформа рекомендована как современная технология и метод определения секреторных фенотипов старения клеток.

**Ключевые слова:** старение клеток, секреторный фенотип, фибробласт, цитокины

D. Alimbetov, T. Nurgozhin, T. Davis, D. Kipling

#### Investigation of senescence associated secretory phenotypes using MSD platform

This scientific research aimed to investigate senescence associated secretory phenotypes using up to date technologies. Furthermore, cell senescence stage was studied using senescence associated  $\beta$  – galactosidase (SA- $\beta$ -gal) and 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) labelling index being used for cell proliferation analysis. Main senescence associated secretory phenotype components were determined using high throughput MSD (Mesoscale discovery) platform. Results obtained from this research have suggested that the MSD platform can be recommended as a reliable method for detecting senescence associated secretory phenotype components.

**Key words:** cell senescence, secretory phenotype, fibroblasts, cytokines

Қартаюу физиологиялық тұрғыдан алғанда жас ұлғаюына байланысты пайда болатын аурулар мен дегенерациялардың негізгі себебі болып табылады. Осыған байланысты қартаюу барысында пайда болатын Альцгеймер ауруы, остеопороз, қант диабеті және басқа да аурулардың алдын алу және емдеу терапия-

сын дамыту жұмыстары қазіргі таңда басты тенденцияға ие. Дегенмен, жастың ұлғаюының өзі жоғарыда аталған аурулардың негізгі факторы болып табылатындықтан, қартаюу механизмін (молекулалық немесе жасушалық деңгейде) кешенді түрде түсіну маңызды. Мұндай көзқарас ағзадағы қартаюу барысында пайда болатын

көптеген аурулардың дамуын төмендетуге өз ықпалын тигізери сөзсіз.

Жасушалардың қартаюу негізінен *in vitro* және *in vivo* жағдайларында өтетін митоздардың салдарынан репликативтік қартаюуға ұшырауы және ары қарай бөлінбеу сатысына ие болуымен түсіндіріледі. Аталған жасушалар *in vivo* жағдайында ағзаның қатерлі ісікке қарсы механизмі ретінде өмір сүрулері мүмкін, алайда бүгінде олардың биактивті заттар – ақуыздар бөлетіндігі белгілі болып отыр. Ол “ұлы ақуыздарды” – қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптер деп атайды [1]. Қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптер құрамына цитокиндер (IL6 және IL-8), хемокиндер [2] және де басқалар кіреді. Олардың мөлшерінің көбейіп кетуі ағзаға және жасушаларға кері әсерін тигізуі, сонымен қатар қартайған жасушаларды иммундік мақсатта адам ағзасынан тазалауға септігін тигізуі де мүмкін [3].

#### **Зерттеу әдісі және нысанасы**

Қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптерді анықтау мақсатында төмендегі материалдар мен әдістемелер қолданылды. Адам терісінен алынған фибробласттар линиясы Кориелл медициналық зерттеулер институтынан (Coriell Institute for Medical Research), жасушаларды өсіру қоректік орталары (DMEM), 10 пайыздық ұрықтық бұзау сарысуы (FCS) Life technologies компаниясынан, антибиотиктер және де басқа қажетті реагенттер Sigma Aldrich компаниясынан сатылып алынды. Фибробласттар 3% оттегі (O<sub>2</sub>) және 5% көміртегімен (CO<sub>2</sub>) қамтамасыз етілген инкубаторларда 37°C температурада өсірілді. Мұндай төменгі оттегімен фибробласттарды өсіру қартаюу барысында пайда болатын секреторлық фенотиптердің “табиғи” жағдайда бөлінуіне ықпалын тигізеді деген болжам бар [4].

Қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптерді эксперименталды түрде анықтауға қажетті қоректік органы дайындау ертеректе жарыққа шыққан әдістемеге сүйене отырып жүзеге асырылды [4]. Қажетті жасушалар саны алдын ала есептеліп, олар 6 ұялы планшеттерге 10%-тік сарысу қосылған қоректік ортада өсірілді. 37°C температурада 2 күндік инкубациядан кейін жасушалардың қоректік ортасы 0,5% сарысу қосылған қоректік

ортамен алмастырылды. Келесі екі күндік инкубациядан кейін еш сарысу қосылмаған қоректік ортамен тамақтандырылған жасушалардан 24 сағаттан кейін экспериментке қажетті үлгілер алынды. Қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптер компоненттері MSD ден алынған реагенттерді қолдана отырып SI-6000 Имиджері арқылы анықталды.

#### **Зерттеу нәтижелері және оны талқылау**

Жасушалардың қартаюу дәрежесін қартаюумен байланысты  $\beta$  – галактозидаза арқылы анықтау нәтижесі 1 Суретте көрсетілген.

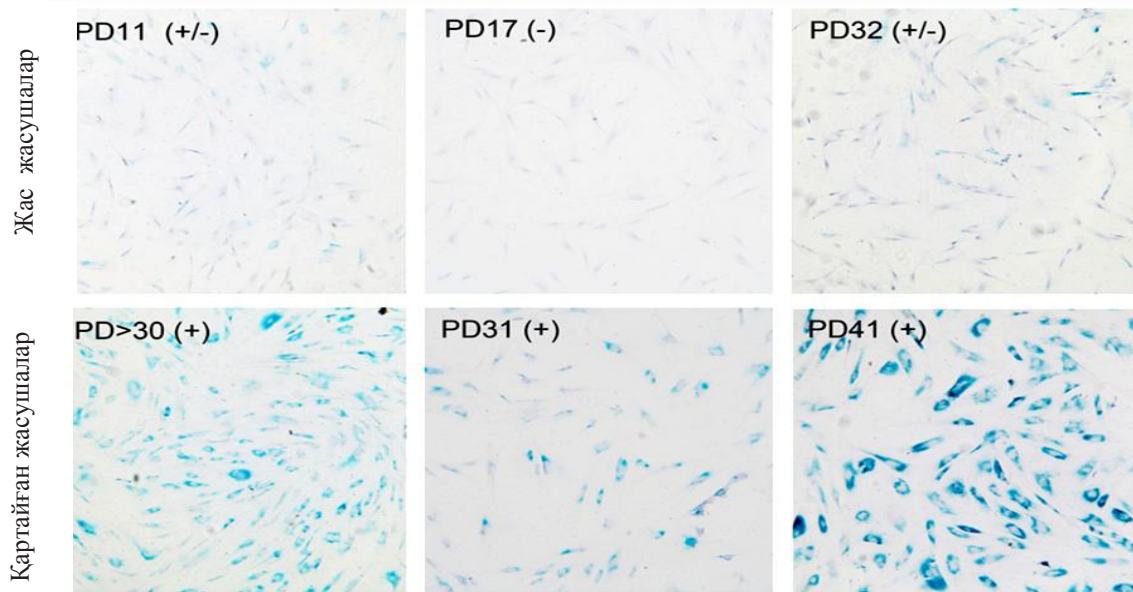
Жоғарғы суретте жасушалардың қартаюу дәрежесі фибробласттардың көгілдір түске боялуымен көрсетілген. Мұндай көгілдір түс тек қартайған жасушаларда  $\beta$  – галактозидазының рН 6.0 кезінде моносахаридтерді айналдыру нәтижесінде пайда болатындығы белгілі [5]. Суретте көрсетілгендей қартайған жасушалардың көгілдір түске боялу дәрежесі мен олардың морфологиялық көрсеткіштері жас жасушалармен салыстырғанда ерекшеленеді.

Сонымен қатар, жасушалардың бөлінгіштік қабілеті 5-бром-2-дезоксидуридинмен индекстік маркерлеу әдісі бойынша анықталды (Сурет 2).

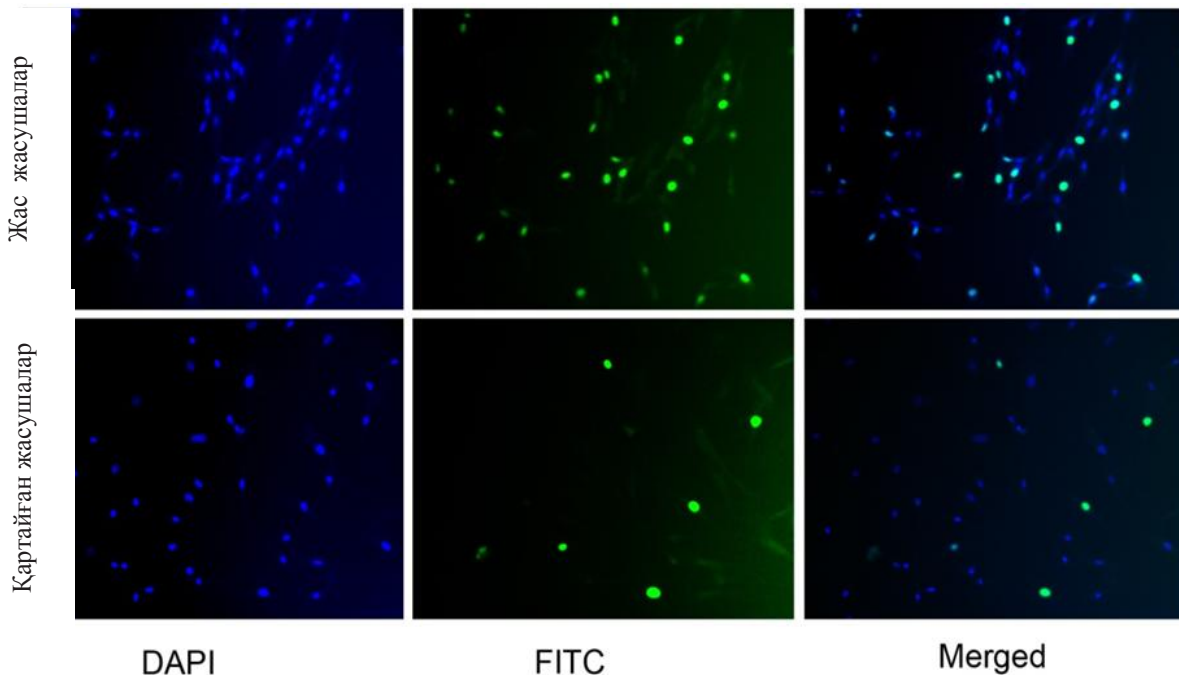
Суретте жас және қартаюуға ұшыраған адам терісі фибробласттарының қартаюу дәрежесі, жасуша бөлінуінің S-фазалық кезеңіндегі ядроға қосылысқан 5-бром-2-дезоксидуридиннің (BrdU) флуоресценциясын бақылау арқылы анықталды. Аталған суретте көрсетілгендей, қартайған жасушалардағы бөліну кезеңіндегі жасушалар саны жас немесе әлі де бөлініп жатқан жас жасушаларға қарағанда көп төмен. Бұл көрсеткіштер жоғарыда атап өтілгендей (Сурет 1) жасуша қартаюуының индекстік маркерлері болып табылады. Мұнда DAPI-мен барлық ядролар маркерленсе, FITC мен тек бөліну кезеңіндегі жасушалардың ядролары маркерленді.

Жасушалардың қартаюу дәрежесі анықталып олардың секреторлық фенотиптерді бөле бастауларына көз жеткізілген соң олардың қоректік орталары фенотиптерді анықтау үшін жиналып алынды.

Бірінші кестеде жасушалардың қоректік ортаға бөлетін қартаюуға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптер туралы мәлімет берілген. Mesoscale Discovery (MSD) платформасын қолдана отырып 12 компоненттердің мөлшерлері анықталды.



**1 сурет** - Жасушалардың қартаю дәрежесін қартаюмен байланысты  $\beta$  – галактозидазаны қолдану арқылы анықтау (мұнда PD – population doublings ағылшын тілінен популяциялық бөліну).



**2 сурет** - Жасушаларды 5-бром-2-дезоксинуридинмен индекстік маркерлеу (BrdU)

Егер жас және қартайған жасушалардан бөлінген секреторлық фенотиптердің мөлшерлерін салыстыратын болсақ, олардың қартайған жасушаларда ұлғаю тенденциясына ие болу-

ын байқауға болады. Әсіресе, бұл тұжырымның дәлелін кестеде келтірілген МСР-3  $\alpha$  арқылы көруге болады. Қартаюға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптер мөлшерінің адам

**1 кесте** - Секреторлық фенотиптердің негізгі компоненттері

Акуыздар	Адам терісінен алынған фибробласттар (Mean±SEM)					
	Жас	Қартайған	Жас	Қартайған	Жас	Қартайған
GM-CSF	1,38±0,49	2,09±0,97	1,03±0,57	4,78±2,67	1,78±0,61	7,03±3,51
IFN- $\gamma$	5,00± 1,98	4,97±0,95	3,07±1,54	22,62±6,55	6,08±3,71	12,74±1,81
IL-10	0,49±0,21	0,76±0,47	0,41±0,27	2,43±1,49	0,58±0,46	2,97±1,76
IL-12 p70	0,34±0,15	0,37±0,09	0,29±0,14	1,34±0,64	0,47±0,32	0,854±0,14
IL-1 $\beta$	0,27±0,09	0,38±0,1	0,28±0,03	1,04±0,20	0,35±0,05	1,04±0,09
IL-2	0,33±0,12	0,51±0,24	0,36±0,14	1,25±0,65	0,49±0,35	1,16±0,63
IL-6	0,63±0,15	0,75±0,24	15,91±7,57	22,56±5,80	1,08±0,74	7,63±2,33
IL-8	2,98±1,11	2,73±1,00	2,23±0,55	9,35±2,60	3,15±1,22	10,26±2,28
TNF- $\alpha$	0,66±0,23	0,96±0,32	0,37±0,22	3,95±1,44	0,89±0,52	2,10±0,53
IL-7	0,04±0,03	0,06±0,02	0,01±0,01	0,20±0,08	0	0,15±0,10
MCP-2	0,06±0,06	0,42±0,42	0,25±0,25	2,56±1,97	0	2,28±2,28
MCP-3 $\alpha$	78,26±17,4	83,78±16,8	57,81±8,45	185,95±10,8	63,70±21,8	184,32±9,4

ағзасында тигізетін кері әсері бұдан бұрын да талқыланып жүр [6, 7]. Қартайған жасушалардан бөлінген секреторлық фенотиптердің жоғары мөлшері айналасындағы жас жасушалардың жылдам қартаюуына немесе олардың ісік жасушаларына айналып кетуіне әкеліп соқтыруы мүмкін.

Бұл жұмыста болашақта жүзеге асырылатын кең ауқымды ғылыми зерттеудің алғашқы қадамдық нәтижелері келтірілді. Қартайған жа-

сушалардан бөлінген секреторлық фенотиптерді анықтау келешекте олардың мөлшерлерін азайту жолында жаңа дәрі-дәрмектер іздестіру үшін мол мүмкіншіліктер беруі ықтимал.

Қартаюға байланысты пайда болатын секреторлық фенотиптерді MSD платформасын қолдану арқылы анықтау ғылыми зерттеу жұмысы Кардифф Университетімен бірігіп жүргізілді.

#### Әдебиеттер

- 1 Rodier F., Campisi J. Four faces of cellular senescence // *J Cell Biol.* -2011. -Vol. 192, № 4. – P. 547-56.
- 2 Rodier F., Coppe J.P., Patil C.K., Hoeijmakers W.A., Munoz D.P., Raza S.R., Freund A., Campeau E., Davalos A.R., Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion // *Nat Cell Biol.* -2009. -Vol. 11, № 8. – P. 973-9
- 3 Kang T.W., Yevsa T., Woller N., Hoenicke L., Wuestefeld T., Dauch D., Hohmeyer A., Gereke M., Rudalska R., Potapova A., Iken M., Vucur M., Weiss S., Heikenwalder M., Khan S., Gil J., Bruder D., Manns M., Schirmacher P., Tacke F., Ott M., Luedde T., Longerich T., Kubicka S., Zender L. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development // *Nature.* -2011. -Vol. 479, № 7374. – P. 547-51.
- 4 Coppe J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Munoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor // *PLoS Biol.* -2008. -Vol. 6, № 12. – P. 2853-68.
- 5 Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (September 1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (20): 9363 – 7. doi:10.1073/pnas.92.20.9363. PMC 40985. PMID 7568133.
- 6 Kipling D., Davis T., Ostler E.L., Faragher R.G. What can progeroid syndromes tell us about human aging? // *Science.* -2004. -Vol. 305, № 5689. – P. 1426-31.
- 7 Csiszar A., Sosnowska D., Wang M., Lakatta E.G., Sonntag W.E., Ungvari Z. Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* -2012. -Vol. 67, № 8. – P. 811-20.