

11. Christ – Crain, M. Copeptin in the diagnosis of vasopressin – dependent disorders of fluid homeostasis / M. Christ – Crain, W. Fenske // *Nature reviews. Endocrinology*. – 2016. – Vol. 12, № 3. – P. 168 – 176.
12. Vasopressin neurons respond to hyperosmotic stimulation with regulatory volume increase and secretory volume decrease by activating ion transporters and Ca²⁺ channels / K. Sato – Numata, T. Numata, Y. Ueta, Y. Okada // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2021. – Vol. 55, № 1. – P. 119–134.
13. Release and decay kinetics of copeptin vs AVP in response to osmotic alterations in healthy volunteers / W.K. Fenske, I. Schnyder, G. Koch [et al.] // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2018. – Vol. 13, № 2. – P. 505–513.
14. Vasopressin and breathing: review of evidence for respiratory effects of the antidiuretic hormone / M. Proczka, J. Przybylski, A. Cudnoch – Jedrzejewska [et al.] // *Frontiers in Physiology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 744177.
15. Thirst perception, drinking, arginine vasopressin activity and associated neurohumoral factors / E.O. Aloamaka, E. Amabebe, J.O. Ozoene, L.F.O. Obika // *Journal of African Association of Physiological Sciences*. – 2018. – Vol. 6, № 1. – P. 1 – 13.
16. Martino, M. Copeptin and stress / M. Martino, G. Arnaldi // *Endocrines*. – P. 2021. – Vol. 2. – P. 384–404.
17. Changes in plasma copeptin levels during hemodialysis: are the physiological stimuli active in hemodialysis patients? / E.M. Ettema, J. Kuipers, S. Assa [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 5. – P. e0127116.
18. Szczepanska – Sadowska, E. Disregulation of the renin – angiotensin system and the vasopressinergic system interactions in cardiovascular disorders / E. Szczepanska – Sadowska, K. Czarzasta, A. Cudnoch – Jedrzejewska // *Current Hypertension Reports*. – 2018. – Vol. 20. – P. 19.
19. Angiotensin AT1A receptors expressed in vasopressin – producing cells of the supraoptic nucleus contribute to osmotic control of vasopressin / J.A. Sandgren, D.W. Linggongoro, S.Y. Zhang [et al.] // *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. – 2018. – Vol. 314, № 6. – P. R770–R780.
20. Arginine vasopressin and pathophysiology of COVID – 19: an innovative perspective / H.M. Al – kuraishy, A.I. Al – Gareeb, S. Qusti [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 143. – P. 112193.
21. Arginine vasopressin and posterior reversible encephalopathy syndrome pathophysiology: the missing link? / B. Largeau, O. Le Tilly, B. Sautenet [et al.] // *Molecular Neurobiology*. – 2019. – Vol. 56, № 10. – P. 6792 – 6806.
22. Arginine vasopressin (AVP): a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo – hypophyseal system / F. Rotondo, H. Butz, L.V. Syro [et al.] // *Pituitary*. – 2016. – Vol. 19, № 4. – P. 345–355.
23. Exercise – associated hyponatremia: 2017 update / T. Hew – Butler, V. Loi, A. Pani, M.H. Rosner // *Frontiers in medicine*. – 2017. – Vol. 4, № 21. – P. 2017.
24. Cairns, R.S. Incidence of exercise – associated hyponatremia and its association with nonosmotic stimuli of arginine vasopressin in the GNW100s Ultra – endurance marathon / R.S. Cairns, T. Hew – Butler // *Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. – 2015. – Vol. 25, № 4. – P. 347–354.
25. Dresely, F. Störungen des Natriumhaushalts / F. Dresely // *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS*. – 2018. – Vol. 53, № 7. – P. 492–502.
26. Bankir, L. Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation / L. Bankir, D.G. Bichet, N.G. Morgenthaler // *Journal of internal medicine*. – 2017. – Vol. 282, № 4. – P. 284–297.
27. Bichet, D.G. Vasopressin and the regulation of thirst / D.G. Bichet // *Annals of Nutrition & Metabolism*. – 2018. – Vol. 72, № 2. – P. 3–7.
28. Copeptin levels increase in response to both insulin – induced hypoglycemia and arginine but not to clonidine: data from GH – stimulation tests / J. Stankovic, K. Kristensen, N. Birkebæk [et al.] // *Endocrine connections*. – 2023. – Vol. 12, № 11. – P. e230042.
29. Lake, D. NMDA receptor – dependent signaling pathways regulate arginine vasopressin expression in the paraventricular nucleus of the rat / D. Lake, S.A.L. Corrêa, J. Müller // *Brain Research*. – 2019. – Vol. 1722. – P. 146357.

Сведения об авторах

Д.А. Оберюхтин* – аспирант

А.Е. Черницкий – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

А.П. Сарапульцев – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Information about authors

D.A. Oberiukhtin* – Postgraduate Student

A.E. Chernitskiy – Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher

A.P. Sarapultsev – Doctor of Sciences (Biology), Leading Researcher

* Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

oberuhtindenis@gmail.com

УДК: 57.085.23

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ МАРКЕРОВ ФЕРРОПТОЗА С ПОМОЩЬЮ ПЦР

Парамонова Анастасия Владиславовна¹, Мелехин Всеволод Викторович^{1,2}

¹НОИИЦ ХФТ ХТИ

ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

²Кафедра биологии и биотехнологий

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Ферроптоз – новая форма программируемой клеточной смерти, характеризующаяся избытком свободного эндогенного железа, перекисным окислением липидов и нарушением работы системы

антиоксидантной защиты клетки. Изучение механизмов данного типа клеточной гибели и его моделирование *in vitro* имеет большой потенциал для разработки новых методов терапии резистентных злокачественных опухолей и других заболеваний. Основные биологические маркеры ферроптоза – ацил – КоА синтетаза длинноцепочечного члена семейства 4 (ACSL4) и эффектор глутатионпероксидазы 4 (GPX4). **Цель исследования** – разработать методику оценки уровня ферроптоза с помощью ПЦР в реальном времени. **Материал и методы.** Подбор праймеров осуществляли с помощью NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), определение специфичности праймеров, подбор оптимальной температуры отжига и концентрации ДМСО выполняли с помощью ПЦР с градиентом температур и электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле. Далее определяли уровень экспрессии ACSL4 и GPX4 в клетках под действием индуктора ферроптоза (эрастина) методом ПЦР в реальном времени. **Результаты.** Установленные с помощью ПЦР с градиентом температур и электрофореза оптимальные температуры отжига праймеров составили 54°C как для ACSL4, так и для GPX4, присутствие в реакционной смеси ДМСО в данном случае никак не повлияло на результат реакции и ее специфичность. При определении уровня экспрессии мРНК маркеров в клетках глиобластомы под действием эрастина установили статистически значимое повышение ACSL4, уровень экспрессии GPX4 не отличался от интактных клеток. **Выводы.** Рассматриваемые в данной работе праймеры подходят для определения уровня ферроптоза в культивируемых клетках человека через определение уровня экспрессии ACSL4 и GPX4; данные праймеры могут использоваться в дальнейших исследованиях для изучения ферроптоза.

Ключевые слова: ферроптоз, ПЦР, электрофорез, глиобластома.

DEVELOPMENT OF A PCR – BASED METHOD FOR ASSESSING FERROPTOSIS MARKERS

Paramonova Anastasia Vladislavovna¹, Melekhin Vsevolod Viktorovich^{1,2}

¹Scientific, Educational and Innovation Center of the Chemical and Pharmaceutical Technologies, Institute of Chemical Technology

Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin

²Department of Biology and Biotechnologies

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Ferroptosis is a recently discovered form of regulated cell death characterized by excess free endogenous iron, lipid peroxidation, and disruption of the cellular antioxidant defense system. Studying the mechanisms of this type of cell death and its *in vitro* modeling holds great potential for developing novel therapies for resistant malignancies and other diseases. Key biological markers of ferroptosis are Acyl – CoA synthetase long – chain family member 4 (ACSL4) and glutathione peroxidase 4 (GPX4). **The aim of the study** was to develop a method for assessing ferroptosis levels using real – time PCR. **Material and methods.** Primers were selected using NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Primer specificity, optimal annealing temperature, and DMSO concentration were determined using gradient PCR and agarose gel electrophoresis of amplification products. The expression levels of ACSL4 and GPX4 in cells treated with the ferroptosis inducer erastin were then determined by real – time PCR. **Results.** Optimal annealing temperatures for both ACSL4 and GPX4 primers were determined to be 54°C using gradient PCR and electrophoresis. The presence of DMSO in the reaction mixture did not affect the reaction outcome or specificity. Analysis of mRNA expression levels in glioblastoma cells treated with erastin revealed a statistically significant increase in ACSL4, while GPX4 expression remained unchanged compared to untreated cells. **Conclusions.** The primers examined in this study are suitable for assessing ferroptosis levels in cultured human cells by measuring ACSL4 and GPX4 expression. These primers can be used in further research to study ferroptosis.

Keywords: ferroptosis, PCR, electrophoresis, glioblastoma.

ВВЕДЕНИЕ

Понимание механизмов, регулирующих клеточную смерть, имеет решающее значение для оценки их роли в различных заболеваниях, в том числе в злокачественных новообразованиях. В настоящее время существует множество нерешенных проблем в понимании механизмов клеточной смерти в качестве терапевтических мишеней, связанных, например, с возникновением лекарственной устойчивости, отсутствием избирательности лекарственных препаратов и т.д. [1]. Ферроптоз – недавно определенный новый тип программируемой клеточной смерти – связан с накоплением свободного железа (Fe^{2+}) в клетке и последующим железо – зависимым перекисным окислением липидов [2]. Его изучение и моделирование *in vitro* важно для разработки новых методов терапии лекарственно – устойчивых видов опухолей и других заболеваний. Значимую роль в регуляции механизмов

ферроптоза играют ацил – КоА синтетаза длинноцепочечного члена семейства 4 (ACSL4) и эффектор глутатионпероксидазы 4 (GPX4). ACSL4 участвует в синтезе полиненасыщенных жирных кислот, которые далее подвергаются перекисному окислению в процессе ферроптоза, в связи с чем происходит повышение уровня экспрессии мРНК данного фермента [3]. GPX4 – антиоксидантный фермент, снижающий уровень гидроперекисей в сложных липидах, предотвращающий таким образом перекисное окисление мембран [4]; при ферроптозе уровень экспрессии данного маркера снижается [5].

Цель исследования – разработать методику оценки уровня ферроптоза с помощью ПЦР в реальном времени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на культивируемых клетках глиобластомы человека (A – 172, ATCC CRL 1620), полученной из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» Института цитологии РАН (Россия, г. Санкт – Петербург).

Требования к основным параметрам праймеров, которые были учтены при подборе: длина 17–22 нуклеотида, процент GC 40–60%, диапазон температур отжига 50 – 58°C, длина продукта амплификации 150–350 пар оснований. Все олигонуклеотидные праймеры были синтезированы на заказ («ДНК – Синтез», Россия).

Для оптимизации условий работы праймеров амплификацию проводили на приборе Accurate 96 (DLAB Scientific, Китай). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 7,5 мкл кДНК, 0,8 пмоль каждого праймера, 12,5 мкл приготовленной смеси 2X HS – qPCR (Biolabmix, Россия). Температурный режим амплификации был следующим: 95°C – 1 мин, затем 40 циклов (95°C – 30 с, градиент температур от 46°C до 54°C – 30 с, 72°C – 30 с). Реакционная смесь с ДМСО объемом 25 мкл содержала 7,5 мкл кДНК, 0,8 пмоль каждого праймера, 12,5 мкл приготовленной смеси 2X HS – qPCR (Biolabmix, Россия), 0,75 мкл ДМСО; температурный режим амплификации был аналогичный. Далее проводили электрофорез продуктов реакции в агарозном геле со следующими условиями: концентрация агарозы 2%, концентрация этидия бромид 0,5 мкг/мл, 80 В, 400 мА, 50 мин. Визуализацию результатов проводили на системе гель – документирования «Взгляд» (Helicon, Россия).

Для выделения суммарной ДНК и проведения обратной транскрипции клетки высевали в культуральные флаконы 25 см². В качестве индуктора ферроптоза использовали эрастин в концентрации 10 мкМ [6], вносили через 24 часа после рассаживания флаконов. Далее через 24 часа экстрагировали суммарную РНК с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), в соответствии с протоколом производителя. Сухой осадок растворяли в 30 мкл воды без нуклеаз обработанной диэтилпирикарбонатом (DEPC) («Евроген», Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта – L» (АмплиСенс, Россия). РНК подвергали обратной транскрипции путем инкубации смеси в термоциклере при 37°C 30 минут.

Для оценки уровня экспрессии ACSL4 и GPX4 в клетках глиобластомы амплификацию проводили в режиме реального времени на приборе Accurate 96 (DLAB Scientific, Китай). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 7,5 мкл кДНК, 0,8 пмоль каждого праймера, 12,5 мкл приготовленной смеси 2X HS – qPCR SYBR Blue (Biolabmix, Россия). Температурный режим амплификации: 95 °C – 1 мин, затем 40 циклов (95 °C – 30 с, 54 °C – 30 с, 72 °C – 30 с). В качестве внутреннего контроля использовали уровень экспрессии гена глицеральдегид – 3 – фосфатдегидрогеназы (GAPDH): Forward 5' – GCAAGAGCACAAAGAGGAAGA – 3', Reverse 5' – ACTGTGAGGAGGGGAGATTTC – 3'. Для анализа результатов использовали метод 2^{–ΔΔCt}.

Статистическая обработка данных проведена в программе RStudio (Version 2022.07.01 © 2009 – 2022 RStudio, PBC) с использованием пакета R (version 4.2.1.). Для сравнения групп использовали t – теста Уэлча.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подобранные пары праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Последовательности выбранных праймеров от 5' – конца к 3' – концу

Праймер	Последовательность 5' – 3'	№ в базе NCBI	Длина ампликона, п.о.
ACSL4 (F)	GCCTCTTGTCTTCCTATTTTC	NM_001318509.2	315
ACSL4 (R)	GCAGCTCAATTTCCTTTTA		
GPX4 (F)	TGGTTAACCTGGACAAGTA	NM_001039847.3	197
GPX4 (R)	CTCTTTGATCTCTTCGTTACTC		

По результатам ПЦР и последующего электрофореза в агарозном геле (Рис. 1) установили, что оптимальные температуры отжига для обеих пар праймеров составили 54°C, а присутствие в реакционной смеси ДМСО никак не повлияло на результат амплификации.

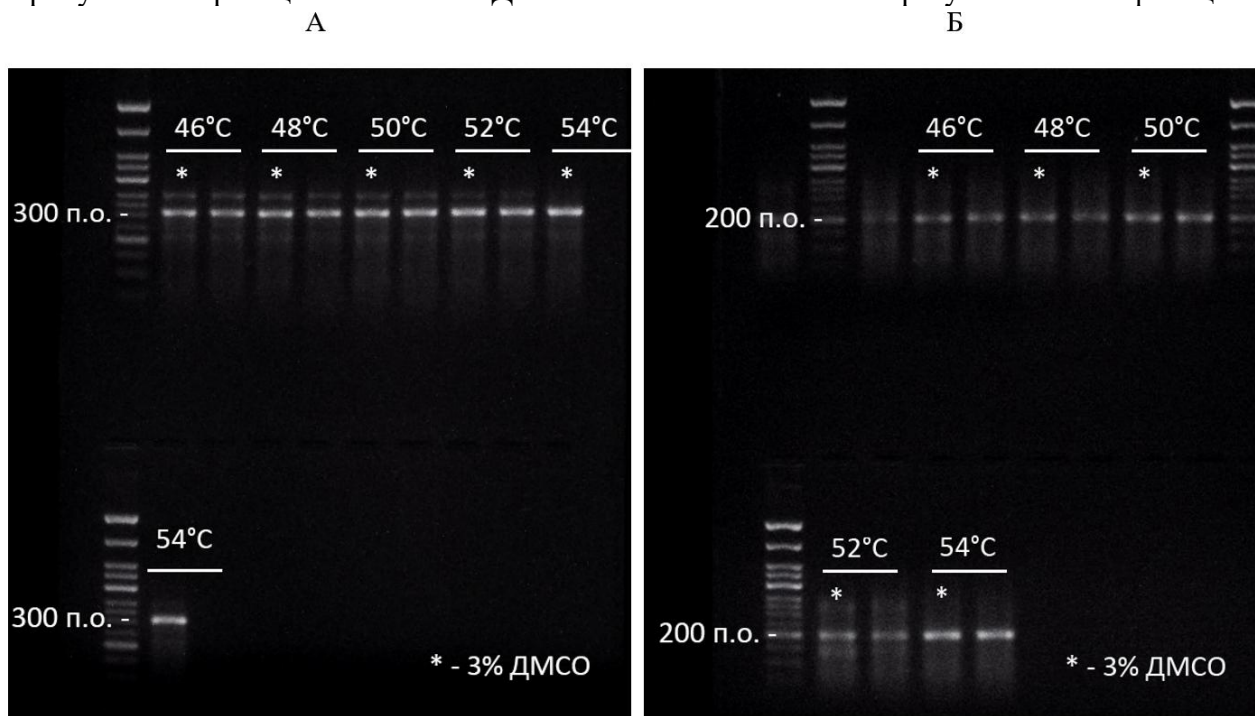


Рис. 1 Электрофорез после ПЦР с градиентом температур. А – ACSL4, длина ампликона 315 пар оснований; Б – GPX4, длина ампликона 197 пар оснований.

В результате оценки экспрессии мРНК ACSL4 и GPX4 в клетках A172 (Рис. 2) установили, что при действии эрастина экспрессия ACSL4 повышалась относительно экспрессии в интактных клетках примерно в 2,5 раза. Уровень экспрессии GPX4 под влиянием эрастина был снижен, однако данное различие не характеризовалось статистической значимостью ($p = 0,0518$).

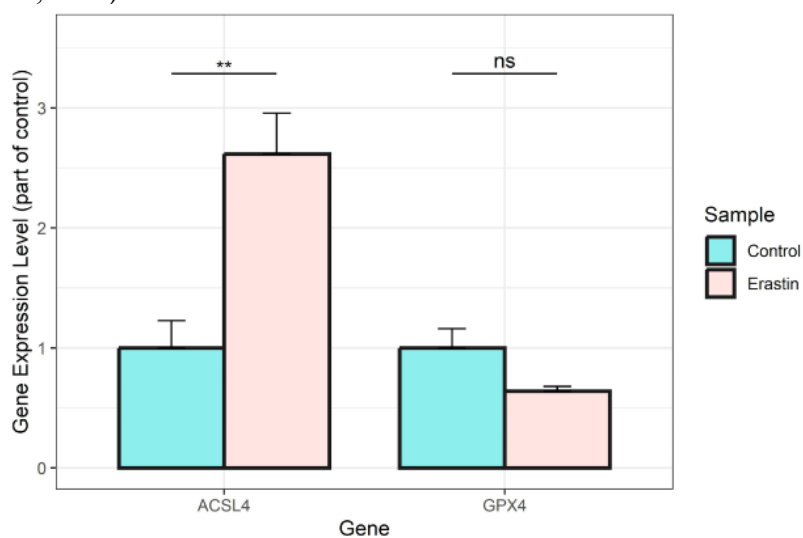


Рис. 2 Относительный уровень экспрессии мРНК ACSL4 и GPX4 в клетках глиобластомы человека (** $p < 0.01$, t – теста Уэлча)

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка уровня экспрессии биологических маркеров ферроптоза – важный этап в изучении этого вида программируемой клеточной смерти, в том числе как терапевтической мишени для разработки новых лекарственных препаратов. Исходя из полученных и описанных выше результатов, предложенный метод оценки уровня ферроптоза в культивируемых клетках человека показал статистически значимый результат, который соотносится с литературными данными. Описанный метод может быть использован в исследовательских работах, направленных на изучение механизмов ферроптоза, в сочетании с методами оценки экспрессии соответствующих белков, что повысит качество таких работ. Также предложенный метод может быть использован в диагностике ряда дегенеративных заболеваний, связанных с интенсивным перекисным окислением липидов, при необходимости оценки рассматриваемых маркеров.

ВЫВОДЫ

В данной статье представлен способ оценки уровня ферроптоза в культивируемых клетках человека с помощью определения уровня экспрессии мРНК основных внутриклеточных маркеров ферроптоза – ACSL4 и GPX4. Подобраны праймеры к данным маркерам, определены оптимальные условия их работы, а также выполнена оценка экспрессии ACSL4 и GPX4 в клетках глиобластомы под действием индуктора ферроптоза. Рассматриваемые праймеры могут быть использованы в дальнейших исследованиях для изучения ферроптоза.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Apoptosis and chemotherapy resistance / J.A. Hickman // *European Journal of Cancer*. – 1996. – Vol. 32, № 6. – P. 921 – 926.
2. Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors / Y. Du, Z. Guo // *Cell Death Discovery*. – 2022. – Vol. 8, № 1. – Article Number 501.
3. Characteristics and biomarkers of ferroptosis / X. Chen, P.B. Comish, D. Tang [et al.] // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2019. – Vol. 10. – Article Number 1316.
4. The diversified role of mitochondria in ferroptosis in cancer / Y. Liu, S. Lu, L.L. Wu [et al.] // *Cell Death & Disease*. – 2023. – Vol. 14, № 8. – Article Number 519.
5. Ключевые маркеры ферроптоза / М.Д. Тохтуева, В.В. Мелехин // *Молекулярная медицина*. – 2024. – Т. 4. – С. 18–27
6. Противоопухолевое действие индукторов ферроптоза на органоиды метастатического колоректального рака / А.В. Разумовская, М.О. Силкина, Т.А. Кулагин [и др.] // *Биотехнология*. – 2023. – Т. 39, № 6. – С. 73–83.

Сведения об авторах

А.В. Парамонова* – инженер – исследователь лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ, студент ХТИ УрФУ

В.В. Мелехин – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ

Information about the authors

A.V. Paramonova – Research Engineer of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies, Student of the Institute of Chemical Technology, UrFU

V.V. Melekhin – Candidate of Science (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

a.v.paramonova@urfu.ru

УДК: 573.6

ДИНАМИКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СТЕПЕНЕЙ АНЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛОКАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА ЗА ПЯТИЛЕТНИЙ ПЕРИОД С 2020 ПО 2024 ГОД

Первушина Елена Николаевна, Ганиева Амиля Тимербаевна, Сатонкина Ольга Алексеевна
Кафедра биологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Частота анемии у больных с онкологией колеблется в зависимости от типа опухоли и характера лечения. Малокровие не даёт иммунной системе человека бороться с опухолевыми клетками в полную силу и