

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Московцев А.А.^{1,2}, Иванов А.В.¹, Зайченко Д.М.¹, Микрюкова А.А.¹, Суханова И.Ф.¹,
Соколовская А.А.¹, Кожевникова Л.М.¹, Кубатиев А.А.^{1,2}

Липополисахариды увеличивают активность IRE1-опосредуемого сигнального пути ответа на гомоцистеин-индуцированный стресс эндоплазматического ретикулума в эндотелиоцитах

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

Введение. Гипергомоцистеинемия (Ггц) – повышение уровня гомоцистеина в плазме крови выше 12 мкмоль/л – независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Гипергомоцистеинемия, являясь сравнительно распространенным состоянием, ассоциирована также с рядом других патологий, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, заболевания почек, остеопороз, инсулиннезависимый диабет. Повышенные концентрации гомоцистеина (Ггц) способны вызывать клеточный стресс (окислительный, стресс эндоплазматического ретикулума), что может приводить к эндотелиальной дисфункции и клеточной гибели. Ггц может отягощать течение инфекционных заболеваний, но механизмы такой модуляции изучены недостаточно. Предполагается, что Ггц является одним из факторов неблагоприятного прогноза SARS-CoV-2 инфекции. **Цель исследования** – изучение в эндотелиальных клетках механизмов действия гомоцистеина, липополисахаридов, их комбинации, а также модулирующего действия фолиевой кислоты и витамина B₁₂.

Методика. Эндотелиоцитоподобные клетки EA.hy926 подвергали действию дитиотрейтола, гомоцистеина, липополисахаридов, гомоцистеина в комбинации с липополисахаридами, с дополнительной инкубацией с витамином B₁₂ и фолиевой кислотой или только фолиевой кислотой. Использовали ДНК-цитометрию для подсчета процента гиподиплоидных клеток, а также МТТ-тест для оценки цитотоксических эффектов. Методом ПЦР-РВ оценивали уровни экспрессии мРНК генов, вовлеченных в ответ клетки на стресс эндоплазматического ретикулума: BiP, XBP1 (общего и сплайсированной формы), IRE1, ATF6 в двух временных точках после воздействия — 6 ч и 24 ч.

Результаты. Впервые показано, что совместное действие липополисахаридов и гомоцистеина приводит к увеличению активности пути IRE1-XBP1 – сигнальной ветви ответа на стресс эндоплазматического ретикулума. Являясь слабыми индукторами стресса ЭПР, липополисахариды значимо потенцируют активированный гомоцистеином сигнальный путь IRE1-XBP1, что мы связываем с взаимодействием сигнальных путей врожденного иммунитета и ответа на стресс. Обнаруженное потенцирование может объяснять небольшое увеличение цитотоксичности при сочетанном действии Ггц и ЛПС в связи с тем, что пролонгированная активность IRE1 обладает проапоптотическим действием. Впервые показано, что фолиевая кислота и витамин B₁₂ снижают активность пути IRE1-XBP1 при действии гомоцистеина и ЛПС, а также дитиотрейтола.

Заключение. В ходе исследования установлено значимое стимулирование сигнального пути IRE1-XBP1 комбинацией ЛПС и Ггц, а также аттенуация этого пути фолиевой кислотой и витамином B₁₂. Однако, потенцирование гомоцистеином цитотоксического эффекта ЛПС невелико. Хотя полученные в ходе данного *in vitro* исследования результаты не позволяют в полной мере рассматривать Ггц как фактор, усложняющий течение инфекционных заболеваний, состояние сосудистой системы и возрастающий риск ее дисфункции должны приниматься во внимание при выборе методов профилактики, терапии и прогноза течения инфекционных заболеваний на фоне гипергомоцистеинемии.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия; липополисахариды; стресс эндоплазматического ретикулума; рибонуклеаза IRE1; сплайсинг XBP1

Для цитирования: Московцев А.А., Иванов А.В., Зайченко Д.М., Микрюкова А.А., Суханова И.Ф., Соколовская А.А., Кожевникова Л.М., Кубатиев А.А. Липополисахариды увеличивают активность IRE1-опосредуемого сигнального пути ответа на гомоцистеин-индуцированный стресс эндоплазматического ретикулума в эндотелиоцитах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 5-18.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.5-18

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кубатиев А.А., Московцев А.А.; сбор и обработка материала – Микрюкова А.А., Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Соколовская А.А.; подготовка иллюстративного материала – Московцев А.А., Иванов А.В.; статистическая обработка материала – Московцев А.А.; написание текста – Московцев А.А., Кубатиев А.А.; редактирование – Московцев А.А., Зайченко Д.М. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: *Московцев Алексей Александрович*, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-60251.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Moskovtsev A.A.^{1,2}, Ivanov A.V.¹, Zaichenko D.M.¹, Mikryukova A.A.¹, Sukhanova I.F.¹, Sokolovskaya A.A.¹, Kozhevnikova L.M.¹, Kubatiev A.A.^{1,2}

Lipopolysaccharides increase the IRE1-mediated unfolded protein response signaling induced by homocysteine in endothelial cells

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education,

Barrikadnaya St. 2/1, Moscow 125993, Russian Federation

Introduction. Hyperhomocysteinemia (HHcy) is a pathological condition described with high levels in plasma of homocysteine (Hcy), a nonprotein α -amino acid homologue of cysteine. It might cause oxidative and endoplasmic reticulum stress with resultant endothelial dysfunction and cell death. HHcy, that is a widespread condition, is associated with a number of other pathologies, such as Alzheimer's disease, schizophrenia, kidney disease, osteoporosis, and diabetes. Early studies emphasize HHcy as one of the crucial and independent risk factors for development of cardiovascular disorders. Moreover, hyperhomocysteinemia can escalate the severity of infectious diseases and even appears as a potential marker for forecasting the course of SARS-CoV-2 infection, as many patients are currently at risk for major clotting events once the infection is established. However, the mechanisms of these processes were poorly studied previously. Therefore, **the major focus** of this work is to study the mechanisms of actions of homocysteine and lipopolysaccharides (LPS) separately and combined together, and modulating actions of them by folic acid and vitamin B₁₂ in endothelial cells.

Methods. Endothelial cell-like EA.hy926 cells were exposed to dithiothreitol, homocysteine, LPS, and Hcy in combination with LPS, with additional incubation with vitamin B₁₂ and folic acid or folic acid alone. The DNA cytometry was performed to calculate the percentage of hypodiploid cells, and the MTT test was conducted to assess cytotoxic effects. RT-qPCR was done in order to evaluate the mRNA expression of the genes involved in the cell response to endoplasmic reticulum stress: BiP, XBP1 (common and spliced form), IRE1, ATF6 at two time points after exposure, 6 h and 24 h.

Results. During our research, it was discovered that the coaction of LPS and Hcy increased the activity of the IRE1-XBP1 pathway, a signaling branch of ER stress. LPS, as weak inducers of ER stress, significantly potentiates the Hcy-activated IRE1-XBP1 signaling pathway. We interpret this event as the interaction of signaling pathways of innate immunity and stress response. The observed potentiation may explain the elevated cytotoxicity under the coaction of Hcy and LPS due to the proapoptotic effect of IRE1 prolonged activity. In this paper, our research demonstrated that folic acid and vitamin B₁₂ restrict the activity of the IRE1-XBP1 pathway under the action of Hcy and LPS as well as of dithiothreitol.

Conclusion. A significant stimulation of the IRE1-XBP1 signaling pathway by a combination of LPS and Hcy, as well as attenuation of this pathway by folic acid and vitamin B₁₂ have been shown. However, the potentiation of the cytotoxic effect of LPS by homocysteine is relatively small. Although the results obtained during this *in vitro* study do not let us to fully consider HHcy as a factor aggravating the course of infectious diseases, the state of the vascular system and the increasing risk of its dysfunction should be taken into account while choosing methods for the prevention, treatment and forecasting of the infectious diseases course against the background of hyperhomocysteinemia.

Keywords: hyperhomocysteinemia; lipopolysaccharides; endoplasmic reticulum stress; ribonuclease IRE1; XBP1 splicing

For citation: Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Sukhanova I.F., Sokolovskaya A.A., Kozhevnikova L.M., Kubatiev A.A. Lipopolysaccharides increase the ire1-mediated unfolded protein response signaling induced by homocystein in endothelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 5-18. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.5-18

Author's contribution: concept and design of the study – Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A.; collection and processing of material –

Mikryukova A.A., Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Sokolovskaya A.A.; preparation of illustrative material – Moskovtsev A.A., Ivanov A.V.; statistical processing – Moskovtsev A.A.; text writing – Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A.; editing – Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Aleksey A. Moskovtsev*, PhD, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: bioinf@mail.ru

Financing. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Grant No. 20-04-60251

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Kozhevnikova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 07.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Гомоцистеин (Гц) – биологически значимая не-протеиногенная аминокислота, относящаяся к ряду серосодержащих, включающему также метионин, цистеин, таурин [1]. Гц преимущественно образуется из незаменимой аминокислоты метионина путем отщепления метильной группы. Выраженное повышение концентрации общего Гц (связанного и несвязанного с белком) в крови из-за редких наследственных дефектов участвующих в метаболизме Гц ферментов ассоциировано с преждевременным развитием сердечно-сосудистых заболеваний в раннем подростковом возрасте и даже в детстве [2]. Сравнительно распространенным состоянием является умеренное повышение концентрации Гц, отражающее менее серьезные генетические дефекты и дефицит факторов метаболизма Гц (фолиевая кислота, витамин В₁₂, витамин В₆) [2] [3]. При гомоцистеинурии – патологическом состоянии, характерном для детского возраста, – концентрация Гц в плазме крови находится в миллимолярном диапазоне [4]. Гипергомоцистеинемия (Ггц) – повышение уровня гомоцистеина в плазме крови выше 12 мкмоль/л – считается независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [5]. Гипергомоцистеинемия также ассоциирована с рядом других патологий, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, заболевания почек, остеопороз, инсулиннезависимый диабет. К развитию Ггц приводит комбинация генетических и различных внешних факторов, нарушающих метаболизм метионина: дефекты реметилювания Гц, возникающие в связи с недостаточностью (гомозиготной и гетерозиготной) ферментов бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы (ВНМТ), метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНФР); дефицит кофакторов и косубстратов – витаминов В₁₂, В₆, фолие-

вой кислоты; хроническая почечная недостаточность; использование различных лекарственных препаратов, влияющих на обмен Гц. Метаболизм метионина начинается с его превращения метионинаденозилтрансферазой в S-аденозилметионин (SAM), сульфоний-ион которого облегчает взаимодействие метильной группы с нуклеофилами [1]. Метильная группа SAM необходима более чем для 100 реакций трансметилювания, включая метилирование ДНК, РНК, аминокислот в белках, фосфолипидов и др. [1]. Все метилтрансферазы ингибируются продуктом реакции S-аденозилгомоцистеином (SAH). По этой причине эффективное удаление SAH чрезвычайно важно для функционирования клетки [6]. S-аденозилгомоцистеин гидролизуеться в гомоцистеин и аденозин ферментом SAH гидролаза, встречающимся во всех клетках.

Гомоцистеин может реметилюваться в метионин или конвертироваться в цистеин транссульфуванием. Существует 2 основных пути реметилювания Гц с образованием метионина. Первый из них катализируется повсеместно распространенной метионин синтазой (MS), кофактором этой реакции является кобаламин, а донором метильной группы выступает 5-метилтетрагидрофолат. Последний представляет собой главную форму фолата в плазме крови и образуется в результате восстановления 5,10-метилентетрагидрофолата ферментом метилентетрагидрофолатредуктазой [6]. Второй путь реметилювания представлен в печени и в меньшей степени в почках. Реакция катализируется бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазой при участии в качестве кофактора пиридоксаль-5'-фосфата, производного витамина В₆. Донором метильной группы является бетаин, образующийся при окислении холина.

Гомоцистеин транссульфуруется в цистеин через цистатионин. Для превращения цистатионина в ци-

стеин и α -кетомасляную кислоту необходим витамин B_6 . Транссульфирование имеет ограниченное тканевое распределение и в основном представлено в печени, почках, кишечнике и поджелудочной железе. Конверсия метионина в цистеин необратима, и, как известно, цистеин не является незаменимой аминокислотой [6].

Гомоцистеин в повышенной концентрации может быть токсичен для клеток. Высокий уровень Гц вызывает повреждение эндотелиальных клеток артерий, что способствует тромбозу и развитию атеросклероза [7]. Когда лабораторным животным вводили $0,1 \pm 0,3$ мМ гомоцистеина, в их артериях наблюдалось утолщение интимы, пролиферация гладкомышечных клеток, повышенная десквамация эндотелия и увеличение числа пенистых клеток [8]. Неблагоприятные эффекты Гц в высоких концентрациях были подтверждены в более поздних работах и изучены более детально. Например, Гц способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний путем ингибирования реэндотелизации [9], индуцирует циклин А в гладкомышечных клетках [10], снижает циркулирующие липопротеины высокой плотности [11]. Гомоцистеин в результате конверсии в гомоцистеин-тиолактон способен вызывать посттрансляционные модификации белков, которые способствуют индукции аутоиммунного ответа [11] и снижению эффективности тромболитика [12].

Ключевыми патофизиологическими механизмами, лежащими в основе токсичности высоких концентраций гомоцистеина, считаются окислительный стресс [13, 14] и стресс эндоплазматического ретикулума [15, 16]. Обсуждается возможность [17] и вероятных механизмов индукции окислительного стресса. Тиольная группа Гц аутоокисляется в процессе циркуляции в присутствии церулоплазмينا – главного медь-связывающего белка плазмы, с формированием гомоцистина и перекиси [18]. Однако, цистеин окисляется гораздо быстрее гомоцистеина [19], при этом концентрации цистеина в 20 – 25 раз выше, чем гомоцистеина, и при этом цистеин не проявляет токсического действия. Кроме того, характерной чертой окислительного стресса является также повышение экспрессии и синтеза белков теплового шока, особенно HSP70, что предотвращает внутриклеточную агрегацию белков и повреждение клеток. Однако, нами не было зарегистрировано увеличение экспрессии цитоплазматических HSP70 при действии 5 мМ гомоцистеина в линиях клеток U937 и HeLa.

Гц может косвенно индуцировать окислительный стресс путем понижения транскрипции, трансляции [20] и каталитической активности антиоксидантных ферментов, таких как глутатион пероксидаза (GPx)

и супероксиддисмутаза (SOD) [21]. Было показано, что проинкубированные с Гц эндотелиальные клетки аорты быка характеризуются значительным снижением активности GPx. Гц снижает экспрессию и секрецию внеклеточной SOD, наиболее распространенного фермента в гладкомышечных клетках сосудистой стенки. Окислительный стресс может быть вызван также стрессом ЭПР [22], хотя это может зависеть от условий индукции стресса ЭПР [23].

Гипергомоцистеинемия является сравнительно распространенным состоянием, поэтому ее патофизиологические эффекты, по-видимому, необходимо учитывать как неблагоприятный фон при возникновении и развитии других заболеваний, однако, данный вопрос недостаточно изучен. Высокую актуальность в настоящее время в связи со стремительным распространением COVID-19 имеют пневмонии. Показано, что высокий уровень гомоцистеина в крови пациентов на ранних стадиях течения COVID-19 инфекции является прогностически неблагоприятным фактором развития в последующие дни тяжелой пневмонии [24]. Гц может выступать в качестве триггерного механизма развития клеточного стресса (окислительного стресса, стресса ЭПР), эндотелиальной дисфункции, тромбоза в микрососудах легких и негативно влиять на течение и исход острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) различной этиологии, в том числе при SARS-CoV-2 инфекции. Изучение роли гомоцистеина в острозавывающихся патологических состояниях, в частности, патогенезе ОРДС приобретает особую актуальность. В нашей работе мы изучили способность липополисахаридов (ЛПС) модулировать цитопатические эффекты, вызываемые повышенной концентрацией гомоцистеина в культуре клеток, фенотипически близких к эндотелиальным. Нами исследована индукция маркеров стресса эндоплазматического ретикулума и прослежена динамика активации сигнального каскада IRE1-XBP1. С учетом ранее показанных благоприятных эффектов фолиевой кислоты и витамина B_{12} на уровень гомоцистеина и патологические последствия гипергомоцистеинемии [15], нами изучена их модулирующая активность на сигнальный каскад IRE1-XBP1.

Методика

Клеточная линия. В работе использовалась гибридная эндотелиоцитоподобная клеточная линия EA.hy926, любезно предоставленная Dr. C.J. Edgel (University of North Carolina, США). Линия была получена путем слияния первичной эндотелиальной клеточной линии HUVEC с клеточной линией аденокарциномы легкого A-549. Для культивирования клеток

использовали среду DMEM (Gibco, США) с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10 % инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L- глутамина, 1% NEAA. Рост клеток проходил в инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37 °С в 5% CO₂/95% воздушной атмосфере. Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в 3-4 сут по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию моноклона 3-минутной экспозицией в растворе трипси-на-ЭДТА (0,05%) (ПанЭко, Россия). В экспериментах использовали клетки 3-13 пассажей. Пассирование клеток осуществляли по достижению культурами 90 % конфлюэнта.

Оценка жизнеспособности клеток методом исключения красителя. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего. Аликвоту суспензии объемом 20 мкл от каждого образца смешивали с равным объемом 0,4% раствора красителя трипанового синего и помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на автоматическом счётчике клеток Countess™ («Invitrogen», США). Каждый исследуемый образец клеток был подсчитан в дуплете.

Инкубация клеток с дитиотрептолом, гомоцистеином, липополисахаридами, преинкубации с фолиевой кислотой, витамином B₁₂. Клетки инкубировали в ростовой среде с добавлением дитиотрептола в конечной концентрации 1,25 мМ, D,L-гомоцистеина – 1.25 мМ, липополисахарида (Lipopolysaccharides from Salmonella enterica serotype typhimurium, Sigma) – 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, комбинации Гц 1,25 мМ, с липополисахаридами в концентрации 10 мкг/мл в течение от 6 ч и 24 ч, в атмосфере с 5% содержанием CO₂, при 37 °С. Фолиевую кислоту (Folic acid, C19H19N7O6 – AppliChem, Germany) в конечной концентрации 20 мкМ, витамин B₁₂ (Cyanocobalamin, Sigma-Aldrich) – 7,8 нМ – добавляли в ростовую среду перед внесением ЛПС, Гц и ДТТ за 24 ч.

Анализ клеточного цикла и sub-G1 пика. Для исследования изменений клеточного цикла ядерную ДНК окрашивали фенантридиновым флуорофором пропидий йодидом (PI), используя для этой цели коммерческий набор BD Pharmingen™ PI/RNase Staining Buffer и предложенный производителем протокол. Клетки осаждали из ростовой среды центрифугированием при 250 g в течение 5–10 мин (центрифуга «Joan BR4i» с бакет-ротатором («Thermo Electron Corporation», США)), отбирали супернатант и промывали осадок охлажденным (+4 °С) фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего снова осаждали центрифугированием при тех же параметрах. Отобрав супернатант, фиксировали клетки, добавляя по каплям, при постоянном встряхивании, 0,5 – 1,0 мл 75% холодного (–20 °С) этанола. Фиксированные клетки окрашивали на следующий день, до этого момента образцы хранили при +4 °С. Перед окрашиванием клетки отмывали в буфере PBS и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Затем отбирали супернатант и, встряхнув осадок, окрашивали клетки, добавляя 0,5 мл PI/RNase Staining Buffer, после чего инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Анализ суспензии клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном воздушно-охлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце анализировали 25 000 событий. Эмиссию флуоресценции (PI) регистрировали в канале FL2 (563-607 нм). Сбор данных проводили с использованием программного обеспечения CellQuest, версия 6.0, приложенного производителем к прибору. Анализ файловых данных проводили в программе ModFit LT, версия 3.2 («Software House», США).

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность препаратов и влияние на метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста. Для этого клетки инкубировали (24 ч и 48 ч) с препаратами в различных концентрациях в 96-луночном планшете. После инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий). Раствор МТТ (2,5 мг/мл в PBS) стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. После инкубации с МТТ в течение 4 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и вращали планшеты на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение 20 мин, до полного растворения кристаллов формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения поглощения при длине волны 540 нм с помощью фотометра Hidex Chameleon (Hidex Oy, Финляндия).

Выделение суммарной РНК из культивируемых клеток. Выделение клеточной РНК осуществлялось с использованием метода гуанидинтиоционат-фенол-хлороформной экстракции в соответствии с протоколом производителя TRIzol («Invitrogen», США), а также ExtractRNA (Евроген, Россия). Лизис клеток проводился непосредственно в культуральной посуде (чашки Петри, планшеты), после удаления ростовой среды. После пипетирования лизат переносили в стерильные, свободные от РНКаз, полипропиленовые 1,5 или 2 мл микроцентрифужные пробирки типа «эппендорф». К лизатам добавляли хлороформ из расчета 20% от объема TRIzol/

ExtractRNA, встряхивали и оставляли на 10-15 мин при комнатной температуре до разделения фаз. Пробирки центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Верхнюю фазу отбирали и переносили в новые пробирки с внесенным на дно гликогеном. Сверху к образцам добавляли ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 М и пропанол-2 объемом, равным собранной фракции. Пробирки встряхивали и помещали на –20 °С на 1 ч или на всю ночь. Затем образцы скручивали на центрифуге с охлаждением при 10 000 g в течение 30 минут при 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок промывали 1 мл холодного 75-80% этанола. Пробирки центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С и этанол удаляли, затем повторяли промывку еще раз. Осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 15 мин и растворяли в 10-30 мкл воды свободной от нуклеаз. Образцы нагревали до 55 °С на 5-10 мин для полного растворения и затем охлаждали при 2 °С. Выделенную РНК хранили при –70°С. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («ThermoFisher Scientific Inc.», США).

Приготовление образцов суммарной РНК, свободной от ДНК. Выделенную суммарную РНК для предотвращения контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I. Инкубацию образца нуклеиновой кислоты проводили при 37 °С в течение 30 мин. Фермент инактивировали нагреванием при 65 °С в течение 10 мин, предварительно добавив 25 мМ ЭДТА, из расчета 1 мкл на 10 мкл реакционной смеси.

Флуориметрическое определение содержания суммарной РНК в образцах. Количество суммарной РНК в образцах после обработки ДНКазой I определяли флуориметрически с использованием набора QuantiT™ RNA Assay Kit. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием флуориметра Qubit («Invitrogen», США).

Синтез первой цепи комплементарной ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием гексамерных Random праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV (без активности РНКазы H) в составе набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit в соответствии с протоколом производителя.

Полимеразная цепная реакция «в реальном времени» (ПЦР-РВ). Для амплификации фрагментов кДНК исследуемых генов и генов «домашнего хозяйства» использовали наборы специфических праймеров (ДНК-Синтез, Россия) и набор реактивов для проведения ПЦР-РВ qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия). ПЦР-РВ проводили в 96-и луночной пластиковой прозрачной низкопрофильной ПЦР-планшете («Bio-Rad Laboratories,

Inc.», США) на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) по следующему протоколу: шаг начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °С; далее следовало 40 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С в течение 15 с, отжига при 55 °С в течение 30 с, элонгации при 72 °С в течение 30 с. Регистрация флуоресценции SYBR Green, связанного с двухцепочечной ДНК, проходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу SYBR Green. Для подтверждения специфичности реакции, после последнего цикла снимали кривую плавления при следующих условиях: предварительное удерживание при 60 °С в течение 30 с; плавление от 55 °С до 95 °С с временной полкой равной 5 с и шагом 0,5 °С. Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, приложенного к прибору. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма $2^{-\Delta\Delta Ct}$ St, в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (Ct) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах. В качестве референсного гена использовался ген GAPDH. В целях контроля специфичности и качества ПЦР-РВ использовались необходимые контроли (отрицательный контроль без кДНК, контроль без обратной транскриптазы, положительные контроли валидированных мишеней).

Статистический анализ и представление данных. Обработка данных проводилась с использованием критерия Краскела–Уоллиса и программного обеспечения Statistica.

Результаты

Индукция гибели эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 гомоцистеином, липополисахаридом. С помощью ДНК-цитометрии нами было исследовано апоптоз-индуцирующее действие липополисахарида, гомоцистеина при 48-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926. Анализ показал, что инкубация с липополисахаридом в концентрации 1 мкг/мл приводит к заметному росту процента клеток с содержанием ДНК, соответствующим положению пика subG1 на гистограмме (рис. 1), что соответствует преимущественно апоптотическим клеткам. Гомоцистеин в концентрации 500 мкМ приводил лишь к небольшому, но статистически значимому росту процента апоптотических клеток, двукратный рост концентрации Гц индуцировал почти двукратный рост апоптоза, однако, его действие было существенно меньшим, чем липополисахарида в исследованной концентрации.

Анализ потенцирующего действия гомоцистеина на цитотоксичность липополисахарида. С помощью

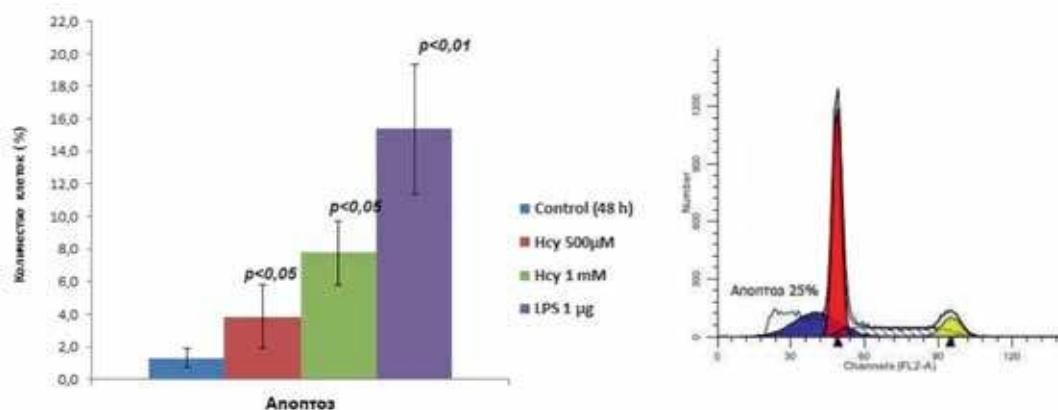


Рис. 1. Апоптоз-индуцирующее действие гомоцистеина (500 мкМ, 1 мМ) липополисахарида (1 мкг/мл) при 48-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926. (Проточная цитофлуориметрия). Справа пример гистограммы апоптоз-индуцирующего действия ЛПС в концентрации 1 мкг/мл через 48 часов.

Fig. 1. Apoptosis-inducing effect of homocysteine (500 µM, 1 mM) lipopolysaccharide (1 µg/ml) at at 48-hour incubation with EA.hy926 cell line (Flow cytometry). On the right is an example of a histogram of the apoptosis-inducing effect of LPS at a concentration of 1 µg/ml after 48 hours.

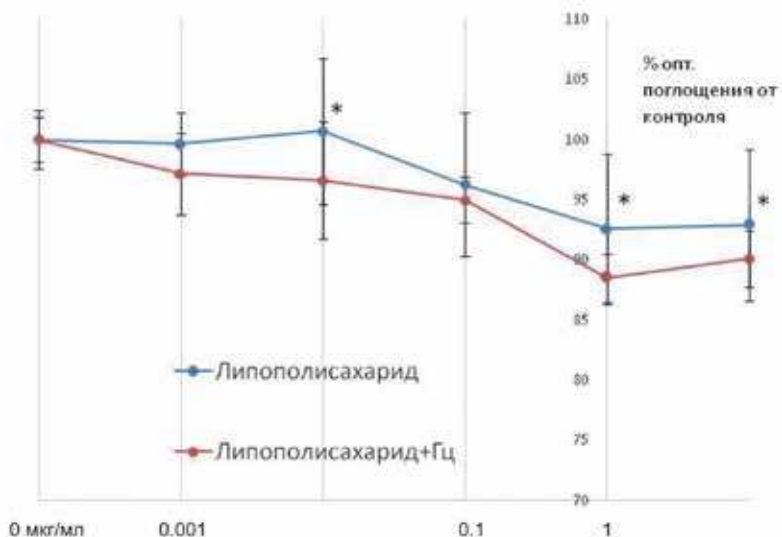


Рис. 2. Цитотоксичность гомоцистеина (1.25 мМ) совместно с липополисахаридом (1 нг-10мкг/мл) при 24-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926 (МТТ-тест); * – $p < 0.09$.

Fig. 2. Cytotoxicity of homocysteine (1.25 mM) together with lipopolysaccharide (1 ng-10 µg/ml) during 24-hour incubation with the EA.hy926 cell line using the (MTT test); * – $p < 0.09$.

МТТ-теста была проведена оценка совместной токсичности гомоцистеина в концентрации 1.25 мМ и липополисахаридов в диапазоне концентраций 1нг/мл – 10мкг/мл при 24-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926.

Как видно из рис. 2, несмотря на слабовыраженную токсичность и небольшую разницу между действием липополисахарида и совместного действия липопо-

лисахарида с гомоцистеином, однонаправленные отличия наблюдаются во всех концентрационных точках, что может указывать на тенденцию гомоцистеина потенцировать цитотоксический эффект полисахарида. Интересной особенностью липополисахарида является гормезис-эффект – небольшой рост оптического поглощения при инкубации 10 нг/мл, при этом гомоцистеин устраняет этот эффект.

Анализ экспрессии маркеров стресса эндоплазматического ретикулаума при действии липополисахарида, гомоцистеина. Согласно полученным данным как гомоцистеин, так и липополисахариды вызывают лишь небольшой рост экспрессии мРНК ключевого шаперона ЭПР BiP при 6-часовой инкубации по сравнению с использованным нами положительным контролем – индуктором дитиотрейтолом (1,25мМ) (рис. 3, А). Вместе с тем, сочетанное действие Гц и ЛПС приводит к более значимому увеличению экспрессии шаперона BiP. Инкубации клеток с витаминами – фолиевой кислотой, сочетанием фолиевой кислоты и V_{12} – не оказывали существенного влияния на уровни мРНК шаперона BiP как при действии гомоцистеина и липополисахаридов, так и их комбинации на 6 ч (рис. 3, В,С) и 24 ч (рис. 3, ВВ,СС). Проведенный анализ не инкубированных с витаминами клеток по сравнению с инкубированными в присутствии ДТТ, ЛПС, Гц и Гц+ЛПС показал, что комбинация ФК и V_{12} приводила к значимому ($p < 0.05$) снижению уровня экспрессии BiP при 6-часовом действии ДТТ (рис. 3, С). Общий уровень мРНК ХВР1 (сХВР1), включающий в себя как сплайсированную форму sХВР1, так и не сплайсированную рибонуклеазой IRE1, стабильно повышался при действии ДТТ (рис. 3, D, DD). Была отмечена воспроизводимая в экспериментах тенденция к повышению уровня сХВР1 при 6- и 24-часовом (рис. 3, D, DD) действии Гц и Гц совместно с ЛПС 10 мкг/мл, при этом витамины демонстрировали тенденцию к снижению этого уровня (рис. 3, E, EE, F, FF).

Цитоплазматический сплайсинг мРНК ХВР1, опосредуемый активируемой рибонуклеазой IRE1, является характерным событием стресса ЭПР [25]. Нами была отмечена тенденция к повышению уровня сплайсированной формы ХВР1 при действии Гц, липополисахариды же потенцировали сплайсинг и приводили к статистически значимому, 2,5-кратному увеличению уровня мРНК ХВР1 на 6-часовой инкубации (рис. 3, G). Интересно, что при действии ДТТ нами не было отмечено роста уровня сплайсированной формы при 6-часовом воздействии (рис. 3, G). Сигнальный каскад IRE1-ХВР1 является наиболее медленным по кинетике активации из трех известных (PERK, ATF6, IRE1), в существенной степени формирующих ответ на стресс ЭПР. Это связано с необходимостью сплайсинга мРНК и трансляции транскрипционного фактора sХВР1, в то время как для осуществления PERK-опосредуемых эффектов требуются минуты (фосфорилирование), начало активации транскрипции фактором ATF6 занимает немногим большее относительно PERK время из-за процессинга ATF6 в комплексе Гольджи и его транспорта в ядро.

Существенное повышение уровня мРНК BiP при 6-часовом действии 1.25мМ ДТТ в клетках EA.hy926, таким образом, происходит вследствие активации ATF6-опосредуемой ветви Unfolded Protein Response (UPR) на фоне неактивной IRE1. Это подтверждается повышением уровня общей формы ХВР1 (сХВР1) (рис. 3, D) при 6-часовом действии ДТТ – ATF6 является транскрипционным индуктором ХВР1 [25]. Инкубация с витаминами не изменяла уровень сплайсированной формы ХВР1 при 6-часовой инкубации с липополисахаридами и Гц (рис. 3, H, I).

24-часовая инкубация с ДТТ, липополисахаридами и Гц приводила к падению уровня BiP ниже контрольного в случае ДТТ и поддержанию повышенной экспрессии BiP для Гц, липополисахаридов и их комбинаций (рис. 3, AA), при этом витамины опять-таки существенно не влияли на уровни BiP, что может указывать на отсутствие прямого или косвенного действия витаминов на фолдинг белка в описанных условиях (рис. 3 ВВ, СС).

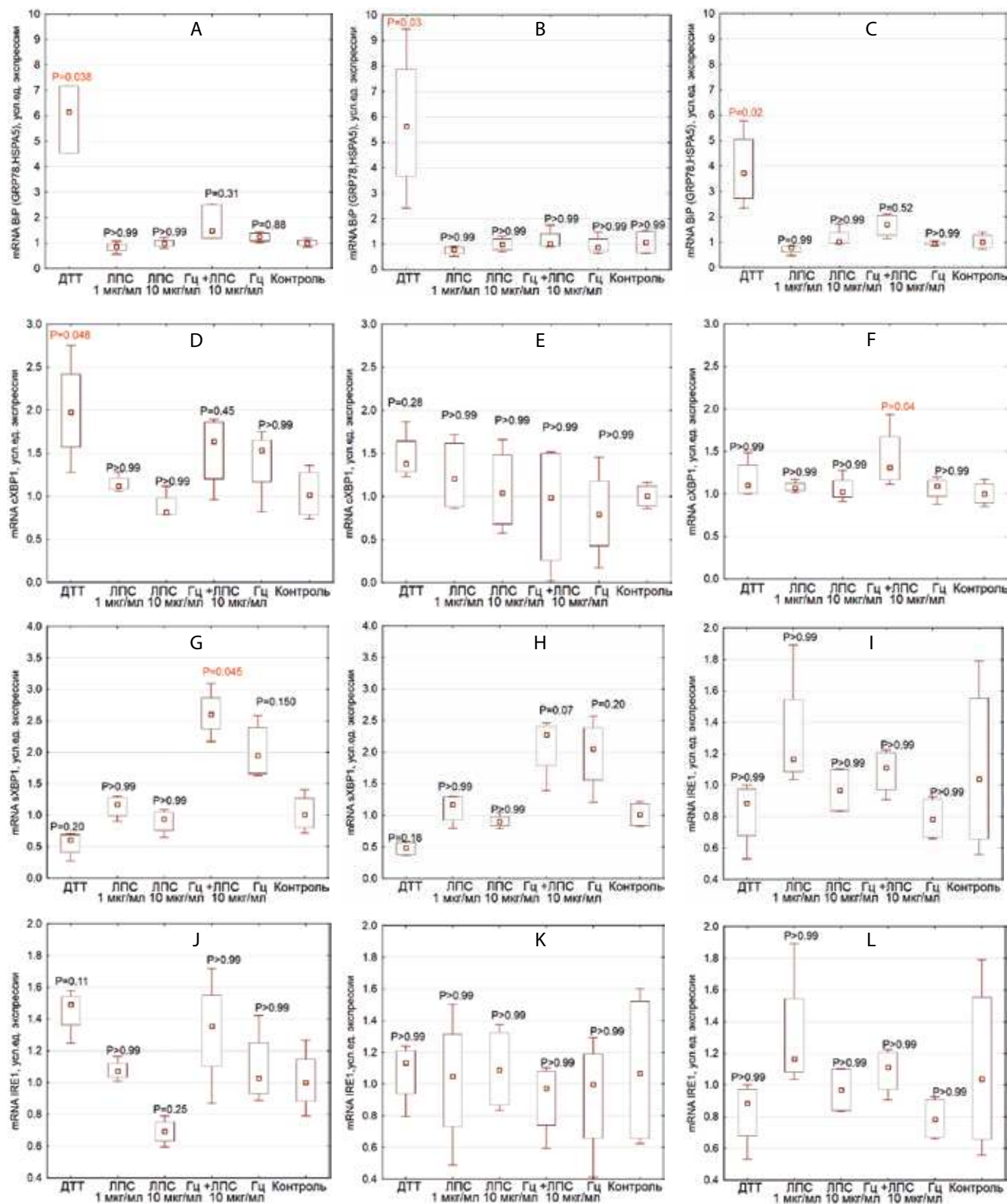
Однако нами было отмечено существенное повышение уровня сплайсированной формы ХВР1 при 24-часовом действии ДТТ и сохранение значимо повышенного ее уровня при действии комбинации Гц с липополисахаридами на фоне снижения уровня BiP для ДТТ и сохранения умеренно повышенного уровня BiP для Гц+ЛПС (рис. 3, GG). Инкубация с витаминами значимо снижала уровень мРНК sХВР1 при 24-часовом действии ДТТ, менее значимое снижение наблюдалось для сплайсинга, индуцированного комбинацией липополисахарида и Гц, а также для Гц в отдельности (рис. 3, HH, II).

Существенных изменений в уровнях экспрессии мембранного белка-сенсора стресса ЭПР ATF6 в большинстве случаев отмечено не было, за исключением небольшого увеличения экспрессии при инкубации с ФК и V_{12} при действии липополисахаридов (рис. 3, OO).

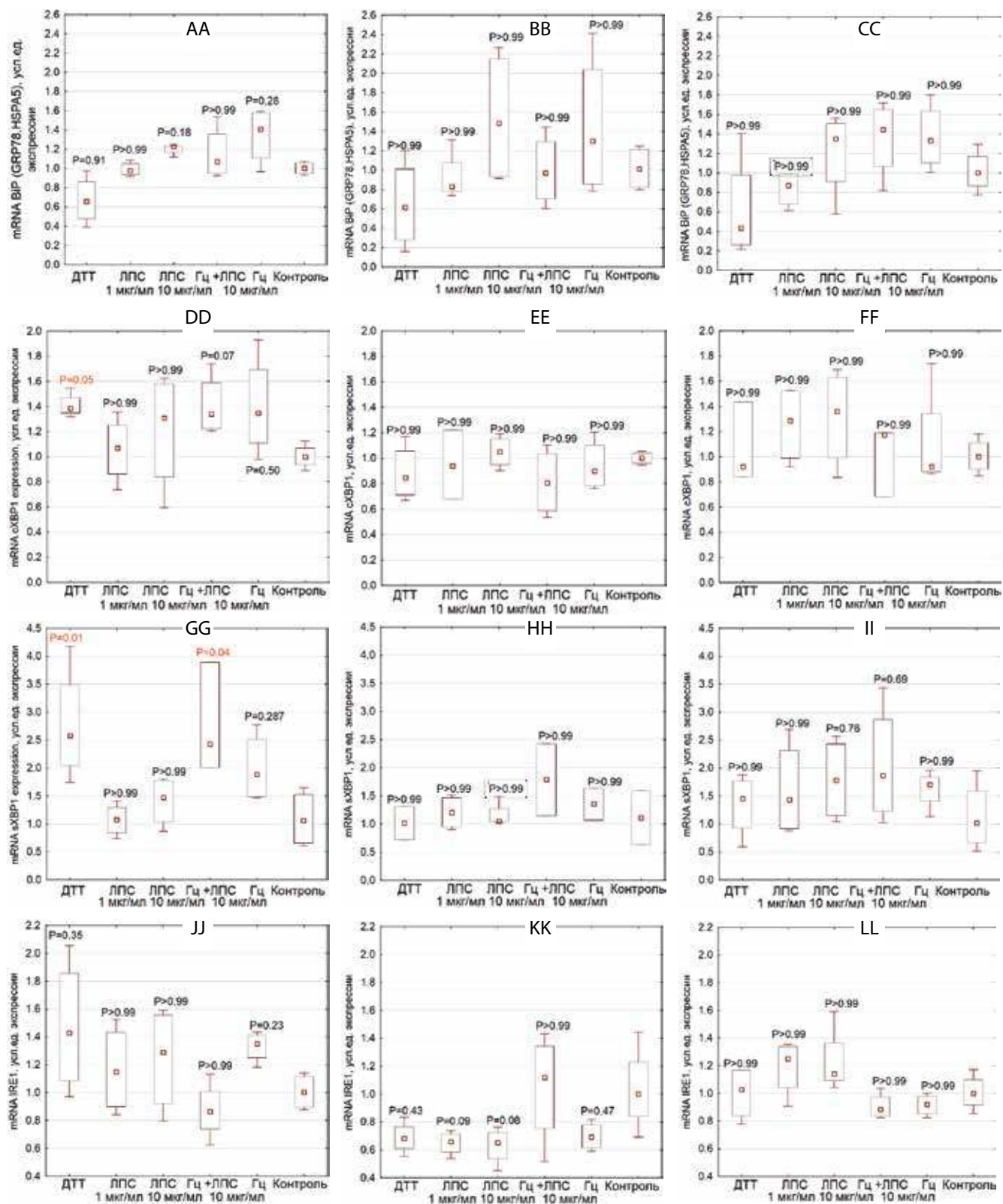
Рибонуклеаза IRE1 на 6-ч (рис. 3, J-L) и 24-ч (рис. 3, JJ-LL) также не меняла существенно существенно своей экспрессии за исключением тенденции к повышению при 6-ч и 24-часовом действии ДТТ (рис. 3, J, JJ), что коррелировало (на 24-часовом интервале) с увеличением IRE1-опосредуемого сплайсинга и уровня общего ХВР1.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что и липополисахариды, и гомоцистеин индуцируют клеточную гибель эндотелиоцитоподобных клеток по механизму апоптоза, при этом наблюдается тенденция к потенцированию гомоцистеином цитотоксического эффекта



Продолжение рис. 3 см. на стр. 14.



Продолжение рис. 3 см. на стр. 15.

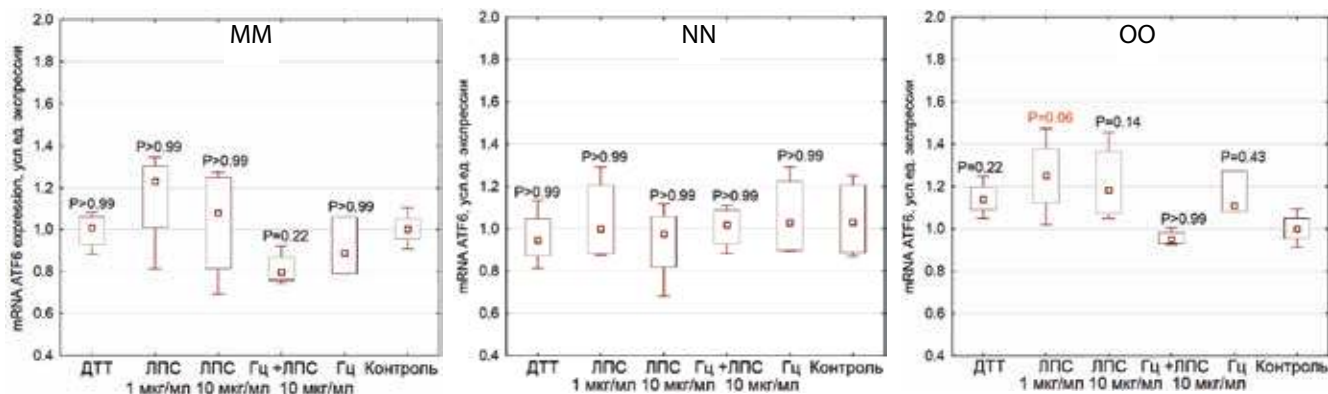


Рис. 3. А-С, АА-СС Экспрессия мРНК BiP при 6 ч (А-С) и 24 ч (АА-СС) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25 мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (В,ВВ), фолиевой кислотой и В₁₂ (С,СС) и без нее (А,АА)

D-F, DD-FF Экспрессия мРНК sXBP1 при 6 ч (D-F) и 24 ч (DD-FF) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (Е,ЕЕ), фолиевой кислотой и В₁₂ (F,FF) и без нее (D,DD);

G-I, GG-II Экспрессия мРНК sXBP1 при 6 ч (G-I) и 24 ч (GG-II) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (Н,НН), фолиевой кислотой и В₁₂ (I,II) и без нее (G,GG);

J-L, JJ-LL Экспрессия мРНК IRE1 при 6 ч (J-L) и 24 ч (JJ-LL) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (К,КК), фолиевой кислотой и В₁₂ (L,LL) и без нее (J,JJ);

MM-OO Экспрессия мРНК ATF6 при 24ч (MM-OO) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (NN), фолиевой кислотой и В₁₂ (OO) и без нее (MM);

Fig.3. Expression of BiP, sXBP1, sXBP1, IRE1, ATF6 mRNA in the presence of dithiothreitol (1.25mM), lipopolysaccharide (1mg/ml), lipopolysaccharide (10mg/ml), D,L-homocysteine (1.25mM), combined action of D,L-homocysteine (1.25mM) for 6 h (A-L) and for 24 h (AA-OO) and lipopolysaccharide (10 mg/ml) with and without incubation with folic acid, folic acid and B₁₂.

липополисахаридов. Нами рассматривался некомпенсированный стресс ЭПР как возможная причина гибели клеток. Согласно полученным данным, гомоцистеин в концентрациях, характерных для гипергомоцистеинемии и для гомоцистинурии, является слабым индуктором шаперона BiP – мы наблюдали лишь незначительное увеличение экспрессии при 6 ч- и 24-часовом действии, при этом липополисахариды при совместном с гомоцистеином действии приносили тенденцию к повышению уровня BiP .

Нами было впервые обнаружено, что совместное действие липополисахаридов и гомоцистеина приводит к значимому росту сплайсинга XBP1 и, соответственно, активности сигнального пути IRE1-XBP1, причем временная динамика активации существенно отличалась от использованного нами классического индуктора стресса ЭПР – ДТТ. В нашей работе мы использовали сравнительно невысокую концентрацию ДТТ для приближения нашей модели к действию гомоцистеина. В такой концентрации ДТТ вызыва-

ет, по-видимому, отсроченную активацию пути IRE1, регистрируемую по уровню сплайсированной формы XBP1. Значительное повышение уровня шаперона BiP на 6 часовом интервале происходит не за счет сенсора IRE1, а за счет активации других сигнальных ветвей UPR, что совместно с изначально высокой фолдинговой емкостью данных клеток (эндотелиоциты – секреторирующие клетки) не создает условий для ранней активации IRE1. Совместное действие Гц и ЛПС приводит к пролонгированной активации IRE1 на фоне сравнительно низкого уровня шаперона. Сами липополисахариды в исследованных концентрациях не являются эффективными индукторами ни шаперона, ни IRE1-опосредованной сигнальной ветви, однако, они способны усиливать активность IRE1-опосредуемого сигналинга. С учетом поэтапной активации IRE1 (димеры – олигомеры) [25–27], можно предположить, что липополисахариды могут повышать рибонуклеазную активность уже активированной IRE1. Известно, что IRE1 имеет гомологию с активируемой путями врожден-

ного иммунитета РНКазой L (RNase L). С учетом повышения активности клеточных рибонуклеаз при активации TLR-рецепторов для защиты от экзогенной РНК, повышение активности IRE1 при действии инфекционных агентов, в том числе включение механизма деградации клеточной РНК RIDD (regulated IRE1-dependent decay), может иметь биологический смысл.

Известно, что пролонгированная активация IRE1 обладает проапоптотическим действием [28, 29], что может быть причиной повышения цитотоксичности при сочетанном действии Гц и ЛПС. Наше исследование также показало, что инкубация с ФК и V_{12} способствовала снижению активности IRE1-опосредуемого сигнального пути при сочетанном действии гомоцистеина и липополисахаридов.

В работе [30] уровни ViP и белка CHOP были значительно повышены в тканях легких мышей, получавших липополисахариды путем интратрахеальной инстилляцией. Кроме того, в культуре клеток нормального бронхиального эпителия NHBE, обработанных 100 мкг/мл ЛПС показан в среднем двукратный рост уровня белка ViP. Также был повышен ряд других белковых маркеров стресса ЭПР, включая ATF6, XBP1, в тканях легких мышей, получавших ЛПС. Кроме того, уровень белков ViP и CHOP в мононуклеарных клетках периферической крови, полученных от пациентов с тяжелым воспалением легких, был значительно выше, чем у здоровых лиц [30].

Считается, что Гц оказывает провоспалительное действие, возможно, за счет окислительного стресса и последующей активации фактора NF- κ B [14]. Стимуляция провоспалительных путей в эндотелиальных клетках приводит к экспрессии молекул адгезии, рекрутированию лейкоцитов к стенке сосуда, их последующей инфильтрации, опосредованной повышенной секрецией хемокинов, и, кроме того, к дифференцировке моноцитов в макрофаги [14]. Также было показано, что индукция обогащенной метионином и обедненной фолиевой кислотой и витаминами B_6 и B_{12} диетой Гц у мышей, нокаутных по апополипротеину E, увеличивала площадь и тяжесть атеросклеротических поражений, а также повышала экспрессию рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE), молекул клеточной адгезии VCAM-1, тканевого фактора и матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9) в сосудах. Эти вызванные Гц эффекты были значительно подавлены, параллельно со снижением уровня Гц в плазме, при добавлении в пищу фолиевой кислоты и витаминов B_6 / B_{12} .

Наши данные согласуются в большей степени с провоспалительным действием гомоцистеина — активация IRE1 способна приводить к активации NF- κ B [31, 32], в нашем же случае имеет место пролонгированная ее

активация. В работе [31] указывается, что именно киназная, а не рибонуклеазная активность IRE1 является ключевой для активации NF- κ B. Однако, в недавней работе был идентифицирован IRE1-зависимый сигнальный путь, который непосредственно контролирует экспрессию/высвобождение провоспалительных хемокинов (CXCL2, IL-6, IL-8) и зависит от неклассического сплайсинга мРНК XBP1 и sXBP1-зависимой экспрессии убиквитинлигазы E2 UBE2D3, которая способствует деградации ингибитора NF- κ B I κ B, что приводит к провоспалительному фенотипу [33].

Хотя в работе [30] была показана прямая активация экспрессии шаперона ViP липополисахаридами, в нашей работе мы наблюдали незначительную индукцию экспрессии шаперона с использованием 10 мкг/мл липополисахарида. Однако, опосредуемый IRE1 сплайсинг возрастал в большей степени, что предположительно может указывать на двунаправленный характер связи сигнальных путей врожденного иммунитета, активируемых липополисахаридами, и ветви IRE1-XBP1.

Нами показано, что фолиевая кислота и витамин B_{12} — ключевые участники процесса реметилирования Гц — способны снижать активность пути IRE1-XBP1 при действии не только Гц и Гц с ЛПС, но и в значительной степени при действии ДТТ. Наши результаты представляют собой интересную параллель с недавней работой группы авторов, в которой использовались *C. elegans* для оценки физиологических эффектов ДТТ [34]. Авторы показали, что ДТТ вызывает дефекты развития у *C. elegans*, но эти дефекты зависят от диеты. Витамин B_{12} в составе диеты, действуя как кофактор для метионинсинтазы, облегчал дефекты развития, вызванные ДТТ. Для установления взаимосвязи между ДТТ и витамином B_{12} , в прямом генетическом скрининге были выделены мутанты *C. elegans*, устойчивые к токсическим эффектам ДТТ. Оказалось, что потеря функции S-аденозилметионин (SAM)-зависимой метилтрансферазы (R08E5.3) придает устойчивость к ДТТ. ДТТ приводил к усилению экспрессии R08E5.3 и модулировал метионин-гомоцистеиновый цикл, истощая пул SAM. Модуляция метионин-гомоцистеинового цикла с помощью ДТТ также приводила к стрессу ЭПР и митохондрий. По мнению авторов, токсичность ДТТ у *C. elegans* связана с модуляцией метионин-гомоцистеинового цикла, однако, для устранения токсичности ДТТ необходим функциональный каскад IRE1-XBP1 [34]. Известно, что соотношение SAM/SAH, или индекс метилирования, — важный показатель интенсивности процессов метилирования в клетке. Интересно, что снижение уровня SAM увеличивает продолжительность жизни и улучшает метаболизм разных орга-

низмов [35]. Для уточнения механизмов обнаруженного нами модулирования сигнального пути IRE1/XBP1 фолиевой кислотой и витамином В₁₂ требуется проведение дополнительных исследований.

Заключение

Таким образом, нами было впервые обнаружено, что совместное действие липополисахаридов и гомоцистеина приводит к значимому росту активности сигнального пути IRE1-XBP1 ответа на стресс эндоплазматического ретикулума. Липополисахариды в исследованных концентрациях являются слабыми индукторами стресса ЭПР, но потенцируют активность сигнального пути IRE1-XBP1, что мы связываем с взаимодействием сигнальных путей врожденного иммунитета и ответа на стресс. С потенцированием может быть связано повышение цитотоксичности при сочетанном действии Гц и ЛПС в связи с проапоптотическим действием IRE1. Нами впервые показано, что фолиевая кислота и витамин В₁₂ снижают активность пути IRE1-XBP1 при действии гомоцистеина и ЛПС, а также ДТТ. Полученные результаты указывают на то, что повышенный уровень гомоцистеина в плазме крови должен приниматься во внимание как фактор, способный усложнить течение инфекционных заболеваний, в частности, пневмоний, что актуально в современных условиях пандемии COVID-19.

Литература

(п.п. 1-22; 24; 26; 28–35 см. References)

23. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система upr (unfolded protein response). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 97-108.
25. Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мещерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А. и др. Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках т-лимфобластной лейкемии человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 56(3): 87-93.
27. Московцев А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы ire1: разделение на временной шкале клеточного стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 21-7.

References

1. Brosnan J., Brosnan M. 5th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr*. 2006; 136: 16365–405. Available: <https://www.pkdiet.com/pdf/aaa/aminoacidwrksp.pdf>
2. Perry I.J., Morris R.W., Ebrahim S.B., Shaper A.G., Refsum H., Ueland P.M. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet (Lond, England)*. 1995; 346: 1395–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92407-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92407-8)
3. Selhub J., Jacques P.F., Rush D., Rosenberg I.H., Wilson P.W.F. Vitamin Status and Intake as Primary Determinants of Homocysteinemia in an Elderly Population. *JAMA*. 1993; 270: 2693–8. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1993.03510220049033>
4. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayudu P.V., et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94: 5923–8. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.11.5923/ASSET/CBD81ED4-E990-4EAE-9528-BAAB56CE7A2A/ASSETS/GRAPHIC/PQ1173230004.JPEG>
5. Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B., et al. Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *N Engl J Med*. 1991;324: 1149–55. <https://doi.org/10.1056/NEJM199104253241701>
6. Finkelstein J.D. The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr Suppl*. 1998; 157: 40–4. <https://doi.org/10.1007/pl00014300>
7. Harker L., Slichter S.J., Scott C.R., Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med*. 1974; 291: 537–43. [doi:10.1056/NEJM197409122911101](https://doi.org/10.1056/NEJM197409122911101)
8. Harker L.A., Ross R., Slichter and Scott S.J.C.R. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest*. 1976; 58: 731–41. <https://doi.org/10.1172/JCI108520>
9. Tan H., Jiang X., Yang F., Li Z., Liao D., Trial J., et al. Hyperhomocysteinemia inhibits post-injury reendothelialization in mice. *Cardiovasc Res*. 2006; 69: 253–62. <https://doi.org/10.1016/J.CARDIORES.2005.08.016>
10. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NES, Tan LC, et al. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1996; 97: 146. <https://doi.org/10.1172/JCI118383>
11. Liao D., Tan H., Hui R., Li Z., Jiang X., Gaubatz J., et al. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ Res*. 2006; 99: 598–606. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000242559.42077.22>
12. Undas A., Brozek J., Jankowski M., Siudak Z., Szczeklik A., Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 1397–404. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000219688.43572.75>
13. Tyagi N., Sedoris K.C., Steed M., Ovechkin A.V., Moshal K.S., Tyagi S.C. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00548.2005>
14. Papatheodorou L., Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9: 1941–58. <https://doi.org/10.1089/ARS.2007.1750>
15. Tripathi M., Zhang C.W., Singh B.K., Sinha R.A., Moe K.T., Desilva D.A., et al. Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by Vitamin B supplementation. *Cell Death Dis* 2016 712. 2016;7: e2513–e2513. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.374>
16. Werstuck G.H., Lentz S.R., Dayal S., Hossain G.S., Sood S.K., Shi Y.Y., et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride bio-

- synthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1263. <https://doi.org/10.1172/JCI11596>
17. Jacobsen D.W. Hyperhomocysteinemia and Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1182–4. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1182>
 18. Starkebaum G., Harlan J.M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest.* 1986; 77: 1370–6. <https://doi.org/10.1172/JCI112442>
 19. Sengupta S., Wehbe C., Majors A.K., Ketterer M.E., DiBello P.M., Jacobsen D.W. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 46896–904. <https://doi.org/10.1074/JBC.M108451200>
 20. Handy D.E., Zhang Y., Loscalzo J. Homocysteine Down-regulates Cellular Glutathione Peroxidase (GPx1) by Decreasing Translation *. *J Biol Chem.* 2005; 280: 15518–25. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501452200>
 21. Upchurch G.R., Welche G.N., Fabian A.J., Freedman J.E., Johnson J.L., Keaney J.F., et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 17012–7. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.27.17012>
 22. Malhotra J.D., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 2277–93. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>
 23. Mesitov M.V., Ignashkova T.I., Meshcherskiĭ M.E., Akopov A.S., Sokolovskaya A.A., Moskovtsev A.A., et al. Induction of the endoplasmic reticulum stress in conditions of acid-base imbalance in human cells of T-lymphoblastic leukemia. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; 87–93. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23072118/>
 24. Yang Z., Shi J., He Z., Lu Y., Xu Q., Ye C., et al. Predictors for imaging progression on chest CT from coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Aging (Albany NY).* 2020; 12: 6037–48. <https://doi.org/10.18632/AGING.102999>
 25. Mesitov M.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2013; 97–108. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24640782/>
 26. Schröder M., Kaufman R.J. the Mammalian Unfolded Protein Response. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 739–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
 27. Korennykh A.V., Korostelev A.A., Egea P.F., Finer-Moore J., Stroud R.M., Zhang C., et al. Structural and functional basis for RNA cleavage by IRE1. *BMC Biol.* 2011; 9: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-47/FIGURES/5>
 28. Tabas I., Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 2011; 13: 184. <https://doi.org/10.1038/NCB0311-184>
 29. Moskovtsev A.A., Klementyeva T.S., Zaychenko D.M., Kolesov D.V., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival. *Patol Fiziol i Eksp Ter.* 2018; 62: 21–7. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.21-27>
 30. Kim H.J., Jeong J.S., Kim S.R., Park S.Y., Chae H.J., Lee Y.C. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Sci Reports.* 2013 31. 2013; 3: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep01142>
 31. Tam A.B., Mercado E.L., Hoffmann A., Niwa M.E.R. Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. *PLoS One.* 2012; 7: 45078. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045078>
 32. Hu P., Han Z., Couvillon A.D., Kaufman R.J., Exton J.H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 3071–84. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006>
 33. Obacz J., Archambeau J., Sicari D., Reste P.J. Le, Pineau R., Martin S., et al. Novel IRE1-dependent proinflammatory signaling controls tumor infiltration by myeloid cells. *bioRxiv.* 2020; 533018. <https://doi.org/10.1101/533018>
 34. Singh G.G.,J. Dithiothreitol causes toxicity in C elegans by modulating the methionine–homocysteine cycle. *Elife.* 2022;11: 76021. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.76021>
 35. Parkhitko A.A., Jouandin P., Mohr S.E., Perrimon N. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell.* 2019; 18. doi: 10.1111/ACEL.13034

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru;

Иванов Александр Владимирович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП;

Зайченко Данила Михайлович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, e-mail: danilamihailovich@mail.ru;

Микрюкова Анна Алексеевна, мл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: mikrianya96@gmail.com;

Суханова Ирина Федоровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com;

Кожевникова Любовь Михайловна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.