

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Родрігеса Руслана Рейнальдовича  
**«МОЛЕКУЛЯРНІ ОСОБЛИВОСТІ ФОЛАТ-ЗАЛЕЖНОГО  
МЕТАБОЛІЗМУ В ПЛАЦЕНТІ ЛЮДИНИ В НОРМІ, ПРИ  
ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ ТА В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ПОЛІМОРФІЗМУ  
ГЕНА МЕТИЛЕНТЕТРАГІДРОФОЛАТРЕДУКТАЗИ В  
ДОСЛІДЖЕННЯХ *IN VIVO*, *EX VIVO* ТА *IN SILICO*»**

представлену на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук  
за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія

Фолієва кислота (вітамін В<sub>9</sub>) складається з залишків азотвмісного гетероциклу птеридину, параамінобензойної та глутамінової кислот. За дії ензимів панкреатичного соку вона перетворюється у активну тетрагідрофолієву кислоту; в цьому процесі беруть участь вітаміни В<sub>12</sub>, С та інші фактори. Авітаміноз супроводжується анеміями різної етіології, порушенням ряду метаболічних процесів, зокрема синтезу холіну, креатину, азотистих основ тощо. В основі прояву біологічної активності фолієвої кислоти лежить її участь в біохімічних процесах перенесення одновуглецевих груп (метильних, оксиметильних і формільних груп) в метаболічних процесах. В цих ензиматичних реакціях активні похідні фолієвої кислоти виконують функцію донорів одновуглецевих фрагментів та кофакторів.

Фолат-залежні процеси лежать в основі реакцій метилування, а донором метильних груп в переважній більшості реакцій виступає S-аденозилметіонін, який при цьому перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн. Такі важливі процеси в клітині як реметилування гомоцистеїну, синтез пуринів і тимідилату *de novo*, ковалентні модифікації хроматину потребують достатньої кількості активної фолієвої кислоти і нормального функціонування так званого фолатного циклу. Функціонування клітини, а саме біоенергетика, регуляція експресії генів, проліферація потребує оптимального протікання фолат-залежних реакцій. Підвищений вміст гомоцистеїну у крові (явище гіпергомоцистеїнемії) розглядають як основний біохімічний показник порушень фолат-залежного переносу одновуглецевих груп. Існує декілька причин порушення фолат-залежних метаболічних процесів. До них відносять стани авітамінозу (за

фолієвою кислотою, вітамінами групи В) та вроджені генетичні вади. Одним з центральних ензимів фолат-залежної системи є метилентетрагідрофолатредуктаза (MTHFR), гетерозиготними носіями поліморфного гена якої (C677T) виступає біля половини європейської людської популяції. За цих умов суттєво знижується активність зазначеного ензиму.

Наразі суттєве значення в репродуктивній медицині надається ролі плаценти, метаболічна активність якої змінюється впродовж вагітності. Через гематоплацентарний бар'єр плід забезпечується необхідними для росту і розвитку речовинами; плацента синтезує низку сполук, необхідних для нормального проходження вагітності і розвитку плоду. Патології функціонування фетоплацентарного кола кровообігу пов'язуються з прееклампсією, порушеннями внутрішньоутробного розвитку, передчасними пологами тощо. Гіпергомоцистеїнемія асоційована з різними ускладненнями вагітності, зокрема з прееклампсією. У плаценті вагітних з цією патологією спостерігається підвищення вмісту гомоцистеїну, а також зниження кількості фолатів.

Функціонування і регуляція фолат-залежних процесів в плаценті, вплив на них надлишкових кількостей гомоцистеїну та поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази відносяться до невирішених питань сучасної молекулярної біології та клінічної біохімії. Для дослідження властивостей і регуляції таких складних метаболічних систем як цикли фолату та метіоніну доречно створити, адаптувати і використати математичну модель, коректне застосування якої бажано перевірити в експериментах *in vivo*.

Отже, мета дисертаційної роботи **Родрігеса Руслана Рейнальдовича**, а саме – проаналізувати експресію генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини впродовж гестації, створити стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму і дослідити *in silico* і в експерименті *ex vivo* як впливає підвищений вміст гомоцистеїну і поліморфізм гена *MTHFR* на фолат-залежні процеси, є сучасною і актуальною.

Рукопис оформлено згідно існуючих вимог. У вступній частині дисертант зупинився на актуальності обраної теми, акцентувавши увагу на невирішених питаннях щодо фолат-залежного метаболізму, його порушень та їх причини, значення в цих явищах гомоцистеїну і можливої ролі зазначених процесів в функціонуванні плаценти. Грамотно сформульовані мета та задачі роботи; наголошується на науковій новизні та практичному значенні одержаних результатів. У розділі присвяченому огляду літератури увага зосереджена на молекулярно-біологічних і біохімічних механізмах фолат-залежних процесів в клітині. Зокрема, детально аналізуються функціонування метіонінового і фолатного циклів, процеси транссульфування, питання поліморфізму генів, які залучені до фолат-залежного метаболізму, а також вплив гомоцистеїну на клітинні процеси. Значну частину цього розділу автор приділяє будові та функціонуванню плаценти як тимчасового органу, що забезпечує нормальний перебіг вагітності і розвиток плоду. Акцентується увага на особливостях фолат-залежного метаболізму в плаценті людини. Моделювання метаболізму *in silico* є важливою частиною літературного огляду. Особливе місце займає опис стехіометричних моделей (методи аналізу метаболічної мережі, елементарні моди, граничні моди), а також використання стехіометричного моделювання. В «Матеріалах та методах досліджень» достатньо повно описуються методики, використані для досягнення поставлених задач. Слід підкреслити різноманітність сучасних методів і підходів, які застосовує Родрігес Р.Р. при вирішенні мети дисертаційної роботи, а саме біоінформатичних, молекулярно-біологічних та математико-статистичних, що зробило висновки з представленої роботи цілком обґрунтованими. Послідувачі розділи присвячено результатам експериментальних досліджень, їх аналізу та узагальненню у відповідності із метою і основними завданнями дисертаційної роботи. Закінчують рукопис висновки та список використаних джерел.

Родрігесом Р.Р. в ході виконання дисертаційної роботи створено стехіометричну модуль фолат-залежного метаболізму в плаценті. Її аналіз виявив 7 ключових метаболітів та 23 елементарні моди цього процесу.

Встановлено, що надходження амінокислоти серину є найважливішим фактором підтримання фолат-залежного метаболізму у стаціонарному стані. Використання запропонованої моделі за умови нормального функціонування плаценти показало, що транссульфування гомоцистеїну є більш важливим для його утилізації, ніж реметилювання, а синтез глутатіону домінує над синтезом таурину. Дуже важливо, що результати цих експериментів *in silico* підтвердженні в досліджах *in vivo* на жіночій плаценті. Дисертантом вперше для плаценти людини визначено так званий індекс метилювання, а саме співвідношення концентрацій S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну. Спрогнозовано в дослідженнях *in silico*, що надлишкова кількість цистеїну призводить до посилення реакцій реметилювання і транссульфування у фолат-залежному метаболізмі. Передбачено, що ці процеси можуть відбуватися внаслідок зміщення рівноваги в процесах обміну фолієвої кислоти та посилення синтезу пуринових основ *de novo*. Реальне існування зазначених метаболічних змін підтверджено в умовах експерименту. Також Родрігесом Р.Р. проаналізовані вміст і інтенсивність синтезу пуринів в плаценті людини (перший триместр вагітності) *de novo*. Дисертантом із застосуванням розробленої ним стехіометричної моделі в досліджах *in silico* передбачено, що гетерозиготність *MTHFR* має наслідком перерозподіл фолат-залежних метаболічних потоків: зниження інтенсивності реакцій метилювання з одночасним посиленням синтезу пуринів.

Таким чином, Родрігесом Русланом Рейнальдовичем вперше створено стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини. Ця модель дозволила грамотно проаналізувати вплив на фолат-залежний метаболізм поліморфізму гену метилентетрагідрофолатредуктази та підвищеної концентрації гомоцистеїну. Оцінено динаміку експресії генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини на різних стадіях вагітності. Проаналізовані зміни вмісту S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну за гіпергомоцистеїнемії. Визначено активність синтезу пуринів *de novo* в плаценті протягом вагітності та вплив підвищених концентрацій гомоцистеїну на цей

процес. Створена автором стехіометрична модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини може бути використана для оцінки ризику виникнення ускладнень вагітності за дії різних факторів.

Отже, як фундаментальне, так і практичне значення представленої дисертації не викликає сумнівів.

Позитивними рисами роботи вважаю те, що передбачення на основі стехіометричної моделі впливу гіпергомоцистеїнемії на процеси метилювання та синтез пуринів *de novo* були підтверджені експериментально. Це підтверджує високу прогностичну цінність, а отже суттєве теоретичне значення запропонованої моделі. Слід зазначити також відмінне володіння автором сучасними комп'ютерними технологіями, методами біоінформатики та молекулярної біології. Все відмічене робить дисертацію високою мірою наукоємною, а її висновки цілком аргументованими.

Наведені в кінці роботи висновки впливають із завдань і є правомірними. Рисунки демонстративні, наведена коректна статистична обробка одержаних даних.

Результати досліджень, які викладено в дисертації Родрігеса Руслана Рейнальдовича, опубліковані у відкритому друці у вигляді 14 публікацій, серед них 7 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України (дві в іноземному виданні), і 7 тез доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій, конгресів та з'їздів.

Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Результати досліджень ілюстровані 9 рисунками і 17 таблицями. Список літератури містить значну кількість сучасних посилань. Автореферат відображає основний зміст дисертації.

Під час аналізу роботи виникли окремі зауваження та запитання.

### **Зауваження:**

1. Відсутній чіткий перехід від оглядового розділу до експериментальної частини, в якому б основна увага була зосереджена на питаннях, які

вирішуються в дисертаційній роботі. Також відсутні переходи між підрозділами експериментальної частини; останні зробили б викладення матеріалу більш логічним і послідовним.

2. В кінці роботи був би бажаний короткий узагальнюючий розділ, де Ви могли сфокусувати увагу на вирішених Вами завданнях та планах на майбутнє.

3. Покращила б сприйняття роботи узагальнююча схема в кінці експериментальної частини.

4. Більша кількість рисунків зробила б експериментальний матеріал більш наочним.

5. Не завжди по тексту розшифровуються аббревіатури.

6. Кількість завдань велика, як для кандидатського дослідження.

7. Назва роботи, а також мета занадто «масивні».

8. Назви ензимів і метаболітів в деяких місцях рукопису наведені курсивом, а в деяких – звичайним шрифтом.

9. Посилання на літературу подані в круглих дужках, а не в квадратних як прийнято.

10. Літогляд займає занадто багато місця: 65 сторінок з 152 сторінок всієї дисертації.

### **Запитання:**

1. Який безпосередній зв'язок фолат-залежного метаболізму з порушенням функції гематоплацентарного бар'єру?

2. Чи розглядаєте Ви відому пошкоджуючу дію S-гомоцистеїну на судинну стінку як важливий патогенетичний чинник прееклампсії?

3. Якими Ви бачите підходи до фармакологічної корекції порушень фолат-залежного метаболізму у плаценті за вагітності?

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. Характеризуючи роботу в цілому можна стверджувати, що вона відповідає профілю 03.00.03 – молекулярна біологія. За

актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичною і практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску дослідника і зроблених висновків дисертація **Родрігеса Руслана Рейнальдовича** «Молекулярні особливості фолат-залежного метаболізму в плаценті людини в нормі, при гіпергомоцистеїнемії та в залежності від поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази в дослідженнях *in vivo*, *ex vivo* та *in silico*» є окремим завершеним дослідженням і відповідає вимогам п.п. 11, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, а її автор **Родрігес Руслан Рейнальдович** заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук по спеціальності 03.00.03 – молекулярна біологія.

Доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України



Ю.В. Данилович

14.09.2021 р.

Підпис Ю.В. Даниловича  
ЗАСВІДЧУЮ  
Зав. канцелярією  
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна  
національної академії наук України  
"14" 09 2021 р.

