

ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця  
На правах рукопису

РОДРІГЕС РУСЛАН РЕЙНАЛЬДОВИЧ

УДК 618.56 + 547.436 + 543.544.5

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**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***

03.00.03  
молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Науковий керівник:  
**Оболенська Марія Юрївна,**  
професор, доктор біологічних наук

**КИЇВ – 2021**

## АНОТАЦІЯ

*Rodríguez P.P.* 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* – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2021.

Фолат-залежний метаболізм одноуглецевих фрагментів — це метаболічна мережа взаємозалежних реакцій, в яких похідні фолієвої кислоти виконують роль кофакторів і донорів одноуглецевих фрагментів для *de novo* синтезу пуринів і тимідилату (фолатний цикл), реметилювання гомоцистеїну до метіоніну і утворення S-аденозилметіоніну (SAM) (метіоніновий цикл). SAM є донором метильної групи для переважної більшості реакцій метилювання, включаючи метилювання ДНК, і субстратом для синтезу поліамінів. Фолат-залежні реакції і тісно пов'язані з ними реакції синтезу глутатіону необхідні для підтримання життєво важливих функцій клітини, а саме проліферації і експресії генів, мітохондріальної трансляції, часткового забезпечення клітини енергоресурсами і підтримання окисно-відновного потенціалу.

Загально визнаним маркером фолат-залежного метаболізму є рівень гомоцистеїну, метаболіту, який знаходиться на перехресті реакцій реметилювання до метіоніну і незворотного транссульфування до цистеїну. Деяка кількість гомоцистеїну секретується в кров. Порушення в системі фолат-залежного метаболізму і утилізації гомоцистеїну призводять до гіпергомоцистеїнемії, яка супроводжує численні мультифакторні захворювання людини і ускладнення вагітності, зокрема, викидні, преєклампсію, передчасні пологи, відшарування плаценти. Порушення у функціонуванні плаценти є основною причиною перелічених ускладнень

вагітності. Молекулярні засади цих ускладнень не до кінця з'ясовані, а вирішення проблеми ускладнень вагітності є актуальною медико-біологічною задачею.

Відомі численні фактори (поліморфізм ензимів, нестача фолієвої кислоти і вітаміна В12, багата на білки дієта, вік людини тощо), які можуть призводити до гіпергомоцистеїнемії. Серед них гетерозиготне С677Т носійство метилентетрагідрофолатредуктази (*MTHFR*) супроводжується зниженням активності ензиму на 30 - 35%, зустрічається майже у 50% європейської і української популяції і асоціюється з деякими ускладненнями вагітності. Чисельність взаємопов'язаних реакцій у системі фолат-залежного метаболізму ускладнює експериментальний аналіз змін в системі, які може привносити будь-який фактор. Для вирішення цієї проблеми звертаються до математичного моделювання з наступною експериментальною перевіркою передбачень на основі моделі.

Робота присвячена аналізу експресії генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини впродовж гестації, створенню стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму з урахуванням тканиноспецифічних особливостей плаценти і дослідженню *in silico* і в експерименті впливу гіпергомоцистеїнемії і поліморфізму гена *MTHFR* на фолат-залежні процеси.

В роботі використані молекулярно-біологічні (культивування клітин і плацентарних експлантів, зворотно-транскрипційна ПЛР у реальному часі і вестерн блот-аналіз), біоінформатичні (стехіометричне моделювання метаболізму, аналіз елементарних мод, топології мережі, ключових метаболітів і балансу метаболічних потоків), аналітичні (високоєфективна рідинна хроматографія/мас-спектрометрія) і статистичні методи обробки даних.

Вперше проаналізовано експресію генів, які кодують ензими синтезу пуринів, реметилування гомоцистеїну, критичні ензими синтезу глутатіону і таурину в зразках плаценти з першого і третього триместрів гестації, і

показано, що концентрація більшості відповідних мРНК у тотальній РНК із суцільної тканини плаценти знижується у третьому триместрі порівняно з першим за виключенням . концентрації мРНК і білка цистеїндіоксигенази, яка суттєво підвищується. Вперше показали, що мРНК трифункціонального гена GART існує в плаценті у двох формах укороченій і повнорозмірній, і частка укороченої форми зменшується у зразках з третього триместру. Функція укороченої форми потребує з'ясування.

Вперше побудовано модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини, враховуючи тканинспецифічність експресії генів. Для створення моделі було обрано відповідні реакції і використані з урахуванням їх тканинспецифічності на підставі аналізу експресії відповідних генів за даними Human Protein Atlas [<https://www.proteinatlas.org/>] і експериментальної перевірки експресії генів *CBS*, *GARS-AIRS-GART*, *MS*, *TYMS*, *CDO*, *GLCC* впродовж гестації.

Для побудови моделі використовували дані про стехіометрію і напрям реакцій. Для аналізу моделі, ключових метаболітів системи та елементарних мод використали програмне забезпечення Metatool [<http://penguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/>]. Програмне забезпечення YANA [<http://yana.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>] було використано для визначення потоків біохімічних реакцій системи. Моделювання і аналіз поведінки системи фолат-залежного метаболізму за різних умов її функціонування виконано із застосуванням аналізу балансу потоків і програмного забезпечення COBRAToolbox [<https://opencobra.github.io/>]. Модель застосували для аналізу поведінки метаболічної мережі при навантаженні гомоцистеїном, що симулює гіпергомоцистеїнемію помірної і середньої тяжкості, і за носійства C677T генотипу метилентетрагідрофолатредуктази.

В результаті аналізу стехіометричної моделі виявлено сім ключових метаболітів (THF, CH<sub>2</sub>THF, CHOTHF, Met, Hcy, Ser і Cys). Показано, що

постачання серину відіграє найважливішу роль у підтриманні гомеостазу системи фолат-залежного метаболізму, що відповідає експериментальним літературним даним і засвідчує адекватність моделі. Згідно моделі за початкових параметрів системи транссульфування відіграє більшу роль в утилізації гомоцистеїну, ніж реметилування, що також узгоджується з літературними даними. Перевага в плаценті віддається синтезу глутатіону перед синтезом таурину, що відповідає співвідношенню мРНК відповідних ензимів у першому триместрі вагітності.

Для експериментальної перевірки моделі були розроблені методи кількісного визначення S-аденозилметіоніну, S-аденозилгомоцистеїну і пуринових азотистих основ в зразках плацентарної тканини, плацентарних експлантах і в культурі клітин MCF-7 за допомогою високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії.

Вміст S-аденозилметіоніну і S-аденозилгомоцистеїну визначали в тканині і культивованих експлантах зрілої плаценти, а синтез пуринів *de novo* в експлантах з першого триместру згідно активності обох процесів впродовж гестації. Зразки зрілих плацент були зібрані у районному пологовому будинку № 3 (Київ, Україна) та в Ірпінському пологовому будинку (Ірпінь, Україна), а зразки після 5 – 7 тижнів вагітності у гінекологічному відділенні міської лікарні №2 м. Києва. Для дослідження було відібрано тільки зразки з неускладненою вагітністю. Кожен зразок супроводжувався особистою анкетною жінки, яка включала дані щодо способу життя, вживання алкоголю, куріння, дієти і професійних ризиків, а також особистим письмовим погодженням жінки на право використання плацентарного матеріалу.

Моделювання гіпергомоцистеїнемії за допомогою збільшення в два рази потоку через реакцію гідролізу S-аденозилгомоцистеїну (SAHH) показало зниження питомої ваги реакцій фолатного циклу і синтезу пуринів і підвищення потоків через метилентетрагідрофолатредуктазу, метіоніновий цикл і транссульфування.

Експериментальні дані, отримані в цій роботі, засвідчили, що інтенсивність синтезу пуринів знижується при культивуванні плацентарних експлантів з 20  $\mu\text{M}$  гомоцистеїном, а вміст SAM і SAH підвищується і при цьому не змінюється співвідношення SAM/SAH.

При моделюванні гетерозиготного носійства C677T метилентетрагідрофолатредуктази ми спостерігали ефект протилежний тому, який викликає гіпергомоцистеїнемія. Адже за умов зниженої активності MTHFR, метилентетрагідрофолат активно використовується для потреб фолатного циклу і синтезу пуринів та не надходить в необхідній кількості до процесів метилювання.

Модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини дозволила оцінити розподіл метаболічних потоків через реакції фолат-залежного метаболізму, визначити ключові метаболіти і елементарні моди і передбачити зміни метаболічних потоків за умов помірної і середньої тяжкості гіпергомоцистеїнемії, генотипу C677T метилентетрагідрофолатредуктази і поєднання обох факторів. **Передбачення на основі моделі стосовно впливу гіпергомоцистеїнемії на процеси метилювання та синтез пуринів de novo були підтвержені експериментально.**

**Ключові слова:** плацента, метаболічне моделювання, фолат-залежний метаболізм, метилювання, синтез пуринових основ, гомоцистеїн, MTHFR.

### **Список публікацій здобувача**

1. Родрігес Р., Лущик І., Оболенська М. Стехіометрична модель фолатзалежного метаболізму одновуглецевих груп у плаценті людини. Укр. біохім. журн. 2012; 84 (4): 20-31. *(Особистий внесок: створення моделі, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
2. Родрігес Р., Корнєєва Л., Ральченко С., Вакуленко О., Манжула Л., Мельник В., Верещак О., Оболенська М. Експресія генів, які кодують ензими ключових реакцій фолат-залежного метаболізму, у плаценті людини в першому і третьому триместрах неускладненої вагітності.

- Перинатологія і Педіатрія. 2014; (4): 24-30. *(Особистий внесок: дослідження експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
3. K. L. Korneeva, R. R. Rodriguez, S. V. Ralchenko, O. V. Martunovska, A. O. Frolova, O. P. Martsenyuk, L. V. Manzhula, V. T. Melnyk, O. Y. Shkoropad, M. Yu. Obolenska. Expression of genes, encoding the enzymes of cysteine metabolism in human placenta in the first and third trimesters of uncomplicated pregnancy. Ukr.Biochem.J. 2016; 88(1): 88-98. *(Особистий внесок: дослідження експресії генів, обробка результатів та підготовка статті до друку)*
  4. R. Rodriguez, O. Vakulenko, S. Ralchenko, A. Kostiuk, L. Porublyova, I. Konovets, I. Voronina, M. Obolenskaya. Quantification of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in human placenta and placental explants under homocysteine treatment. International Journal of Mass Spectrometry. 2017; 421: 279-284. *(Особистий внесок: налагодження методу, визначення вмісту SAM і SAH в плаценті та експлантах, обробка результатів та підготовка статті до друку).*
  5. R. Rodriguez, I. Konovets, S. Ralchenko, M. Kharkhota, A. Kostyuk, V. Kosach, I. Voronina, N. Filimonova, M. Obolenskaya. A low-cost mass spectrometry-based approach for quantifying purines in placental explants. International Journal of Mass Spectrometry. 2021; 460: 116490. *(Особистий внесок: налагодження методу, визначення вмісту пуринових основ в плаценті та експлантах, обробка результатів та підготовка статті до друку).*
  6. Оболенська М., Родрігес Р., Марценюк О. Фолатзалежні процеси у плаценті людини: експресія генів, амінотіоли, проліферація і апоптоз. Укр. біохім. журн. 2011;83(1):5-17.
  7. Obolenskaya M. Yu., Tokovenko B. T., Kuklin A. V., Frolova A. A., Rodriguez R. R., Dotsenko V. A., Dragushchenko O. O. The start of systems

- biology in Ukraine. *Biopolym. Cell.* 2014; 30(1):16-24.
8. Rodriguez, Lushchik, Obolenskaya. Stoichiometric model of folate-related one-carbon unit metabolism in human placenta. The 4th international IMBG Conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives”; 2011. Abstract book. p.200., 2011 September 14-17; Kyiv, Ukraine.
  9. Rodriguez, Obolenskaya. Model of one-carbon metabolism in human placenta. Bridges in Life Sciences 7th Annual Scientific Conference, 2012. Abstract in: *Biopolymers & Cell*, 2012, Vol.28, suppl.2, p.183. 2012 March 30 – April 1; Budapest, Hungary
  10. Rodriguez, Kornieieva, Ralchenko, Obolenskaya. HIF 2 $\beta$  as a marker of oxygenation in human placental explants. Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference, 2013. Abstract book, p.52. 2013 April 5 – 7; Prague, Czech Republic.
  11. Родрігес, Ральченко, Вакуленко, Корнєєва. Експресія гена HIF2A в експлантах плаценти людини, культивованих в умовах гіпоксії і нормоксії. IX Міжнародна Наукова Конференція Студентів і Аспірантів “Молодь і поступ біології”, 2013. Збірник тез. ст.381. 15-19 Квітня 2013, м. Львів, Україна.
  12. Rodriguez, Kornieieva, Ralchenko, Vakulenko, Obolenskaya. Gene expression of the biosynthetic enzymes of folate-mediated 1-carbon metabolism and enzymes of cysteine metabolism in human placentas of the first and the third trimesters of gestation. XI Український біохімічний конгрес. Тези в: *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol. 86, №5, suppl.1, p58. 6-10 жовтня 2014 р., м. Київ, Україна.
  13. Rodriguez, Kornieieva, Obolenskaya. Evaluation of cultivation conditions for human placental explants. . XI Український біохімічний конгрес. Тези в: *Ukr. Biochem. J.*, 2014, Vol. 86, №5, suppl.1, p112. 6-10 жовтня 2014 р., м. Київ, Україна.



14. R. Rodriguez, A. Kostiuk, S. Ralchenko, A. Martynovska, V. Kosach, I. Konovets, L. Porubleva, M. Obolenska. Modeling homocysteine effects on folate-related metabolism in the human placenta. Abstract book of X Parnas Conference. – Acta Biochemica Polonica. – V. 63, Suppl. 1/2016 - P 12. July 10-12 2016. Wroclaw, Poland.

## SUMMARY

**Rodriguez R.R. Molecular characteristics of folate-related one-carbon metabolism in the human placenta during physiological pregnancy, hyperhomocysteinemia, and the polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene according to *in vivo*, *ex vivo* and *in silico* studies** - Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on completion of a scientific degree of the candidate of biological sciences (philosophy doctor) on a specialty 03.00.03 "Molecular biology". - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Folate-dependent metabolism of one-carbon fragments is a metabolic network of interdependent reactions in which folic acid derivatives act as cofactors and donors of single-carbon fragments. One-carbon folate fragments are used in the folate cycle for *de novo* purines and thymidylate syntheses and in the methionine cycle for remethylation of homocysteine to methionine. With the adenosyl methionine is converted to S-adenosylmethionine (SAM), a methyl group donor for the vast majority of methylation reactions, including DNA methylation, and it is also a substrate for polyamine synthesis. Folate-dependent reactions are required to maintain vital cell functions, namely proliferation and gene expression, mitochondrial translation, formation of energy-carrying molecules and the vast majority of methylation reactions.

Homocysteine is a universally accepted marker of folate-related one-carbon metabolism state. It is an intermediate at the crossroad of remethylation to methionine and irreversible transsulfuration to cysteine. Some part of homocysteine is secreted to the blood. The disorders in folate-related metabolism are associated with hyperhomocysteinemia, which accompanies many common diseases and

pregnancy complications (miscarriage, preeclampsia, preliminary delivery, placental abruption). The adverse placental functioning is a cause of mentioned above pregnancy complications. The molecular mechanisms of these complications are not fully understood, and the problem's solution is an actual challenge for the medical and biological community.

The multiple disorders of folate-related metabolism (polymorphism of enzymes, folate and B12 deficiency, protein-rich diet, age, etc.) may induce hyperhomocysteinemia. Among them, the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism is the most notable one. The heterozygous C677T variant of the MTHFR gene is typical for almost 50% of the European and Ukrainian population. It is characterized by a 30 - 35% reduction in enzymatic activity and an increased risk of various pregnancy complications. The number of interdependent reactions of folate-related metabolism complicates the experimental verification of specific perturbations in the system because they simultaneously cause numerous changes. To solve this problem, one can resort to the metabolic computational modeling followed by experimental verification of predicted perturbations.

We focused on reconstructing a stoichiometric model of folate-related metabolism in the human placenta and simulating *in silico* the effects of hyperhomocysteinemia and MTHFR gene polymorphism on folate-related processes in the human placenta and experimental verification of the model's assumptions. We used various methods in this study. The stoichiometric modeling of folate-related one-carbon metabolism, analysis of elementary modes, network topology, key metabolites, and flux balance analysis comprise the bioinformatics methods. The molecular-biological techniques included cell and explant cultivation, reverse transcription and real-time PCR, and

analytical approaches – the high-performance liquid chromatography/mass spectrometry.

Before reconstructing the metabolic model, we analyzed the human placenta's corresponding gene expression using the Human protein atlas [<https://www.proteinatlas.org/>] and RT-qPCR. We confirmed the presence of *CBS*, *GARS-AIRS-GART*, *MS*, *TYMS*, *CDO*, *GLCC* mRNAs in the human placenta.

There were several stages in the model's reconstruction and *in silico* simulation of hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphism. We used the data on stoichiometry and direction of reactions for the model's reconstruction. We took into account the organ's tissue specificity. To analyze the network, namely, key metabolites and elementary modes, we used the open-source software Metatool (<http://penguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/>) and the YANA software [<http://yana.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>] was used to determine the flow of biochemical reactions in the system.

We used the flux balance analysis and COBRAToolbox software (<https://opencobra.github.io/>) to model and analyze the effect of light hyperhomocysteinemia and C677T MTHFR genotype on the folate-dependent one-carbon metabolic system.

We identified seven key metabolites (THF, CH<sub>2</sub>THF, CHOTHF, Met, Hcy, Ser, and Cys). According to the model, serine supply plays a crucial role in maintaining the system of folate-dependent metabolism. This fact corresponds to the experimental literature and demonstrates the model's adequacy. According to the model, the transsulfation is more significant than remethylation in the utilization of homocysteine.

According to the simulation results, the placenta prefers the synthesis of glutathione over the synthesis of taurine. This fact corresponds to the ratio of the corresponding mRNAs in the first trimester of pregnancy.

We quantified S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and purines by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry applied to the placental explants for experimental validation of the model.

We used the term placental explants to quantify S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine and the first-trimester explants to measure the de novo purine synthesis. We collected the samples from uncomplicated pregnancies from the third trimester in the maternity hospital № 3 (Kyiv, Ukraine) and the Irpin maternity hospital (Irpin, Ukraine) and the samples from the first trimester in the Kyiv city hospital №2. Each sample was accompanied by a woman's questionnaire, which included data on lifestyle, alcohol use, smoking, diet, and professional risks.

We simulated hyperhomocysteinemia by doubling the flow through the S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) reaction. It decreased the fluxes through folate reactions and purine synthesis and increased the fluxes through methylenetetrahydrofolate reductase, methionine cycle, and transsulfuration cycle. In the experiment, the cultivation of placental explants with 20  $\mu$ m homocysteine led to a decrease in purine synthesis. The concentration of SAM and SAH increased without the changes in the SAM / SAH ratio.

The simulation of the heterozygous C677T methylenetetrahydrofolate reductase variant induced an opposite effect. When the MTHFR activity is lower, methylenetetrahydrofolate is more actively used for the needs of the folate cycle and purine synthesis at the expense of the methionine cycle. A stoichiometric model of folate-related metabolism in the human placenta was created and experimentally

tested. Therefore, we confirmed **the predictions based on the hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphism simulation in the stoichiometric model in the corresponding experiments.**

**Key words:** placenta, metabolic modeling, folate-dependent metabolism, methylation, purine synthesis, homocysteine, MTHFR.

**List of applicant's publications:**

1. Rodriguez R., Lushchik I., Obolenska M. Stoichiometric model of folate-dependent metabolism of one-carbon groups in the human placenta. Ukr. biochemistry journal 2012; 84 (4): 20-31. (*Personal contribution: creating a model, processing the results and preparing the article for publication*)

2. Rodriguez R., Korneeva L., Ralchenko S., Vakulenko O., Manzhula L., Melnik V., Vereshchak O., Obolenska M. Expression of genes encoding enzymes of key reactions of folate-dependent metabolism in the human placenta in first and third trimesters of uncomplicated pregnancy. Perinatology and Pediatrics. 2014; (4): 24-30. (*Personal contribution: gene expression research, processing of results and preparation of the article for publication*)

3. K. L. Korneeva, R. R. Rodriguez, S. V. Ralchenko, O. V. Martunovska, A. O. Frolova, O. P. Martsenyuk, L. V. Manzhula, V. T. Melnyk, O. Y. Shkoropad, M. Yu. Obolenska. Expression of genes, encoding the enzymes of cysteine metabolism in human placenta in the first and third trimesters of uncomplicated pregnancy. Ukr.Biochem.J. 2016; 88 (1): 88-98. (*Personal contribution: gene expression research, processing of results and preparation of the article for publication*)

4. R. Rodriguez, O. Vakulenko, S. Ralchenko, A. Kostiuk, L. Porublyova, I. Konovets, I. Voronina, M. Obolenskaya. Quantification of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in human placenta and placental explants under homocysteine treatment. International Journal of Mass Spectrometry. 2017; 421: 279-284. (*Personal contribution: debugging the method, determining the content of SAM and SAH in the placenta and explants, processing the results and preparing*

*the article for publication).*

5. R. Rodriguez, I. Konovets, S. Ralchenko, M. Kharkhota, A. Kostyuk, V. Kosach, I. Voronina, N. Filimonova, M. Obolenskaya. A low-cost mass spectrometry-based approach for quantifying purines in placental explants. International Journal of Mass Spectrometry. 2021; 460: 116490. (*Personal contribution: debugging the method, determining the content of purine bases in the placenta and explants, processing the results and preparation of the article for publication).*)

6. Obolenskaya M., Rodriguez R., Martsenyuk O. Folate-dependent processes in the human placenta: gene expression, aminothiols, proliferation and apoptosis. Ukr. biochemistry. magazine. 2011; 83 (1): 5-17.

7. Obolenskaya M. Yu., Tokovenko BT, Kuklin AV, Frolova AA, Rodriguez RR, Dotsenko VA, Dragushchenko OO The start of biology systems in Ukraine. Biopolyme. Cell. 2014; 30 (1): 16-24.

8. Rodriguez, Lushchik, Obolenskaya. Stoichiometric model of folate-related one-carbon unit metabolism in human placenta. The 4th international IMBG Conference for young scientists “Molecular biology: advances and perspectives”; 2011. Abstract book. p.200., 2011 September 14-17; Kyiv, Ukraine.

9. Rodriguez, Obolenskaya. Model of one-carbon metabolism in human placenta. Bridges in Life Sciences 7th Annual Scientific Conference, 2012. Abstract in: Biopolymers & Cell, 2012, Vol.28, suppl.2, p.183. 2012 March 30 - April 1; Budapest, Hungary

10. Rodriguez, Kornieieva, Ralchenko, Obolenskaya. HIF 2 $\beta$  as a marker of oxygenation in human placental explants. Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference, 2013. Abstract book, p.52. 2013 April 5 - 7; Prague, Czech Republic.

11. Rodriguez, Ralchenko, Vakulenko, Korneeva. HIF2A gene expression in human placental explants cultured under hypoxia and normoxia. IX International Scientific Conference of Students and Postgraduates "Youth and the progress of

biology", 2013. Collection of abstracts. Article 381 April 15-19, 2013, Lviv, Ukraine.

12. Rodriguez, Kornieieva, Ralchenko, Vakulenko, Obolenskaya. Gene expression of the biosynthetic enzymes of folate-mediated 1-carbon metabolism and enzymes of cysteine metabolism in human placentas of the first and third trimesters of gestation. XI Ukrainian Biochemical Congress. Those in: Ukr. Biochem. J., 2014, Vol. 86, №5, suppl.1, p58. October 6-10, 2014, Kyiv, Ukraine.

13. Rodriguez, Kornieieva, Obolenskaya. Evaluation of cultivation conditions for human placental explants. . XI Ukrainian Biochemical Congress. Those in: Ukr. Biochem. J., 2014, Vol. 86, №5, suppl.1, p112. October 6-10, 2014, Kyiv, Ukraine.

14. R. Rodriguez, A. Kostiuk, S. Ralchenko, A. Martynovska, V. Kosach, I. Konovets, L. Porubleva, M. Obolenska. Modeling homocysteine effects on folate-related metabolism in the human placenta. Abstract book of X Parnas Conference. - Acta Biochemica Polonica. - V. 63, Suppl. 1/2016 - P 12. July 10-12 2016. Wroclaw, Poland.



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	23
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	32
1.1 Фолат-залежні процеси - базові біохімічні процеси в клітині	32
1.1.1 Метіоніновий і тетрагідрофолатний цикли	34
1.1.2 Процеси транссульфування	40
1.1.3 Зв'язок між транссульфуванням і синтезом глутатіону	43
1.2 Поліморфізм генів, залучених до фолат-залежного метаболізму	44
1.3 Вплив гомоцистеїну на клітинні процеси	46
1.4 Значення фолат-залежних процесів для розвитку системи плацента-плід	48
1.5 Плацента – орган, який забезпечує розвиток плоду і перебіг вагітності в організмі матері	50
1.5.1 Будова плаценти, її розвиток	50
1.5.2 Фактори, що впливають на розвиток плаценти	52
1.5.3 Особливості фолат-залежного метаболізму в плаценті людини	53
1.6 Моделювання метаболізму <i>in silico</i>	58
1.6.1 Стехіометричні моделі	58
1.6.1.1 Методи аналізу метаболічної мережі	64
1.6.1.2 Елементарні моди	65
1.6.1.3 Граничні моди	66
1.6.1.4 Використання стехіометричношо моделювання	66
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	69
2.1 Біоінформатичні методи для реконструкції стехіометричної моделі фолат-залежних процесів	69
2.2 Молекулярно-біологічні методи	70
2.2.1 Об'єкт досліджень	70
2.2.2 Реактиви і обладнання	71
2.2.3 Культивування експлантів і клітин MCF-7	72

2.2.4	Визначення експресії генів фолатного циклу	74
2.3	Аналітичні методи	76
2.3.1	Застосування мас-спектрометрії в дослідженнях метаболізму	76
2.3.2	Виділення і кількісна оцінка SAM і SAN методом твердофазної екстракції і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії	77
2.3.3	Виділення і кількісний аналіз пуринових азотистих основ методом кислотного гідролізу і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії	78
2.4	Статистичні методи обробки даних	80
	<b>РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>81</b>
3.1	Експресія генів фолат-залежного метаболізму в плаценті за даними Human Protein Atlas	81
3.2	Експресія генів фолат-залежного метаболізму в першому і третьому триместрах вагітності	83
3.3	Експресія генів метаболізму цистеїну в першому і третьому триместрах вагітності	85
3.4	Стехіометрична модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини	86
3.4.1	Реакції фолат-залежних процесів, обрані для моделювання	87
3.4.2	Створення стехіометричної матриці фолат-залежного метаболізму	89
3.4.3	Визначення обмежень мережі, які задовольняють умовно стаціонарному стану системи	90
3.4.4	Визначення структури мережі	92
3.4.5	Визначення елементарних мод	95
3.5	Баланс метаболічних потоків у фолат-залежних процесах	98
3.5.1	Функціонування системи за стандартних умов	98
3.5.2	Баланс фолат-залежних потоків в системі після симуляції гіпергомоцистеїнемії	101
3.5.3	Баланс фолат-залежних потоків після симуляції носійства	

C677T мутації у гені метилентетрагідрофолатредуктази	103
3.5.4 Баланс фолат-залежних потоків після одночасної симуляції мутації C677T в гені метилентетрагідрофолат редуктази. і гіпергомоцистеїнемії	105
3.6 Експериментальна перевірка математичної моделі	107
3.6.1 Потенціал метилювання в плаценті людини за умов гіпергомоцистеїнемії	107
3.6.1.1 Характеристики методу високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії для кількісного визначення S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну	107
3.6.1.2 Вміст S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну в зразках цілісної плаценти і плацентарних експлантах, культивованих з гомоцистеїном	110
3.6.2 Вплив гомоцистеїну на синтез пуринів <i>de novo</i>	111
3.6.2.1 Налагодження і валідація методу	111
3.6.2.2 Характеристики методу високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії для кількісного визначення пуринів	113
3.6.3 Концентрація мічених та немічених пуринів у плацентарних експлантах та клітинах MCF-7	115
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	121
4.1 In silico і ex vivo моделі для дослідження фолат-залежного метаболізму	122
4.2 Характеристика системи фолат-залежного метаболізму в плаценті людини за умов фізіологічного перебігу вагітності і носійства дикого типу гена метилентетрагідрофолатредуктази	123
4.2.1 Розподіл фолат-залежних метаболічних потоків в плаценті людини за фізіологічних умов	123
4.2.2 Експресія генів фолат-залежного метаболізму і кінцеві продукти їх активності в плаценті першого триместру і наприкінці вагітності	124
4.2.3 Синтез пуринів в плаценті людини	124

4.2.4. Потенціал метилювання в плаценті	126
4.2.5. Транссульфування і регуляція вмісту цистеїну в плаценті	127
4.3 Фолат–залежний метаболізм в плаценті людини при гіпергомоцистеїнемії	129
4.3.1 Метилювання і транссульфування під впливом гомоцистеїну	129
4.3.2 Синтез пуринів під впливом гомоцистеїну	131
4.3.3 Передбачення змін у фолат-залежному метаболізмі за інших варіантів симуляції	134
4.4 Варіативність показників між різними зразками плаценти	136
ВИСНОВКИ	137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	139
ДОДАТКИ	160

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

10fTHF	N10-формілтетрагідрофолат
5mTHF	N5-метилтетрагідрофолат
AICAR	аміноімідазолкарбоксамід рибонуклеотид
AICART	фосфорибозиламіноімідазол-карбоксамід формілтрансфераза
CBS	цистатіонін- b-синтаза
CD	цистеїндіоксигеназа
CH2THF	N5,N10-метилентетрагідрофолат
CHTHF	N5,N10-метенілтетрагідрофолат
CTGL	цистатіонін-g-ліаза
Cys	цистеїн
DHF, дигідрофолат	
DHFR	дигідрофолатредуктаза
dTMP	деокситимідин монофосфат
dUMP	деоксиуридин монофосфат
EM	елементарна мода
FTS	форміаттетрагідрофолат-синтетаза
GAR	гліцинамід рибонуклеотид
GART	гліцинамід рибонуклеотид формілтрансфераза
GCL	глутамат-цистеїн ліаза
Glut	глутамат
Glut-Cys	g-глутаміл цистеїн
Gly	гліцин
GSS	глутатіонсинтетаза
GSH	глутатіон
Hcy	гомоцистеїн
htDH	гіпотаурин дегідрогеназа
LOD	Limit of detection Ліміт детекції

LOQ	Linit of quantification	Ліміт квантифікації
MAT	метіонін-аденозилтрансфераза	
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7,	клітинна лінія
Met	метіонін	
Methylases	метилтрансферази	
MS	метіонінсинтаза	
MTCH	метенілтетрагідрофолат-циклогідролаза	
MTD	метилентетрагідрофолат-дегідрогеназа	
MTHFR	метилентетрагідрофолат-редуктаза	
PGT	фосфорибозилгліцинамід-формілтрансфераза	
SADC	сульфонілаланіл-декарбоксилаза	
SAH	S-аденозилгомоцистеїн	
SAHH	S-аденозилгомоцистеїн гідролаза	
SAM	S-аденозилметіонін	
Ser	серин	
SHMT	серингідроксиметилтрансфераза	
SulfAla	сульфонілаланін	
THF	тетрагідрофолат	
TS	тимідилат синтаза	
АБП	аналіз балансу потоків	
АМП	аналіз метаболічних потоків	
АТР	аденозилтрифосфат	
ВЕРХ/ЕРІ/МС	Високоєфективна	рідинна
	хроматографія/електророзпилю-вальна іонізація/мас-спектрометрія	
GTP	Гуанідинтрифосфат	
dUMP	деоксиуридину монофосфатуд	
ЗТ- ПЛР	зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція	
ЕС	код ферменту, enzyme code	
КАУ	Київський Академічний Університет	

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Останнім часом все більше уваги приділяється дослідженню ролі плаценти у виникненні акушерської патології, адже порушення у функціонуванні плаценти призводять до розвитку прееклампсії, смертельно небезпечного ускладнення вагітності, затримки росту плоду, викиднів, завмерлої вагітності, передчасних пологів тощо (224). У світі прееклампсія вражає від 5 до 10% вагітних, в Україні вона складає від 10 до 20 % всіх ускладнень вагітності і є причиною материнської (21 %) і перинатальної смертності (12 %) і захворюваності (46 - 78 %) (229). Вирішення проблеми ускладнень вагітності є медико-біологічною задачею для науковців всього світу і соціальною задачею для зняття навантаження на систему охорони здоров'я через догляд за недоношеними немовлятами, хвороби людини в подальшому житті після перенесеного ускладнення і для зменшення негативного балансу між народжуваністю і смертністю, що особливо актуально для України. Як медико-біологічна задача, вона потребує детального дослідження функціонування плаценти в рамках триєдиної системи мати – плацента - плід за умов фізіологічного і патологічного перебігу вагітності.

Плацента - це складна логістична система, яка транспортує поживні речовини від матері до плоду і відпрацьовані метаболіти від плоду до матері. Крім того, плацента є метаболічно активним органом. Її дезінтоксикаційна активність подібна до функції печінки, активні імунні процеси забезпечують її сумісність з материнським організмом, а синтез стероїдних гормонів необхідний для розвитку плоду і підтримання вагітності організмом матері. В плаценті, яка розвивається з яйця (ab ovo), особливого значення набувають базові метаболічні процеси, необхідні для її формування і розвитку, який включає ріст тканини, що відбувається переважно через поділ клітин,

формування спеціалізованих клітин внаслідок диференціювання і морфогенез або утворення тривимірної просторової структури органу. Для активного поділу клітин першочерговою передумовою є синтез попередників нуклеїнових кислот, забезпеченість процесу енергоресурсами і підтримання окисно-відновного стану (176). До значної міри ці вимоги задовольняє фолат-залежний метаболізм одноуглецевих фрагментів (разом з іншими біохімічними процесами), адже він забезпечує синтез пуринових основ і тимідилату, S-аденозилметіоніну (SAM), донора метильної групи для переважної більшості реакцій метилювання, контролює синтез низки амінокислот і поставляє молекули ATP і NADPH, а через пов'язаний з ним синтез глутатіону опосередковано регулює окисно-відновний статус в клітині (5,6). Від рівня пуринів залежить активність білка mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), який є мішенню комплексу рапаміцина і контролює процеси анаболізму і катаболізму в клітині (21).

Загально визнаним маркером фолат-залежного метаболізму є рівень гомоцистеїну, метаболіту, який знаходиться на перехресті реакцій реметилювання до метіоніну і незворотного транссульфування до цистеїну. Деяка кількість гомоцистеїну секретується в кров. Порушення в системі фолат-залежного метаболізму і утилізації гомоцистеїну призводять до гіпергомоцистеїнемії, яка супроводжує численні мультифакторні захворювання людини і, зокрема, викидні, прееклампсію, передчасні пологи, відшарування плаценти (226, 227). Проблему гіпергомоцистеїнемії можна розділити на дві складових – причини і механізм виникнення гіпергомоцистеїнемії і наслідки гіпергомоцистеїнемії і механізм її дії. Щодо першої підпроблеми, то відомі численні фактори (поліморфізм ензимів і найбільш розповсюджений в європейській популяції поліморфізм гена метилентетрагідрофолатредуктазин, *MTHFR*, нестача фолієвої кислоти і вітаміну B12, багата на білки дієта, вік людини тощо), які можуть призводити до гіпергомоцистеїнемії через порушення в утилізації гомоцистеїну, а от з яких



клітин/тканин/органів гомоцистеїн потрапляє в кров і за якої патології – питання, на яке поки що немає чіткої відповіді (230). З приводу другої підпроблеми відомі численні наслідки гіпергомоцистеїнемії, які проявляються у зміні активності певних білків, внутрішньоклітинних процесів, функціонуванні органів і систем (230), а з механізмом дії гіпергомоцистеїнемії ще залишається багато нез'ясованих питань, вирішення яких є актуальною задачею через розповсюдженість гіпергомоцистеїнемії за різної патології у людини.

Хоча гомоцистеїн не є генетично закодованою амінокислотою, він за певних умов присутній у білках, бо модифікує (гомоцистеїнелює) їх, що впливає на структуру і функції білків (88). Гомоцистеїн сприяє утворенню активних форм кисню і оксиду азоту. За поки невідомим механізмом гомоцистеїн проявляє клітинспецифічну дію; він пригнічує проліферацію в ендотеліальних клітинах і посилює її у клітинах мезодермального походження (215). Не виключено, що це обумовлено клітинспецифічними особливостями експресії фолатзалежних генів (7) і концентрацією відповідних метаболітів в клітинах різного типу (228). Даних щодо тканинспецифічних особливостей фолат-залежного метаболізму обмаль, зокрема для плаценти людини, де зазвичай вони стосуються третього триместру гестації.

Доведено, що гомоцистеїн потрапляє до плаценти через плазматичну мембрану мікроворсинок хоріону за участі трьох систем транспорту амінокислот L, A і y+L, метаболізується і потрапляє у кровообіг плоду через таку ж трійку систем транспорту амінокислот, які розташовані на базальній мембрані цитотрофобласту (182). Концентрація гомоцистеїну у пуповинній вені (яка йде від плаценти до плоду) нижча за концентрацію у крові матері, що свідчить про те, що гомоцистеїн активно перетворюється в плаценті, а в пуповинній артерії його концентрація дещо нижча, ніж у пуповинній вені, що свідчить про те, що гомоцистеїн також витрачається плодом (234). Таким

чином гомоцистеїну як транспортується через плаценту так і метаболізується в ній. Внесок в загальний вміст гомоцистеїну в плаценті екзогенних і ендогенних джерел невідомий. Наші попередні дослідження вперше показали, що в плаценті експресується каталітично активний перший ензим на шляху транссульфування гомоцистеїну, цистатіонін- $\beta$ -синтаза; концентрація гомоцистеїну, метіоніну, цистеїну і глутатіону в плаценті залежить від генотипу метилентетрагідрофолатредуктази, концентрації фолатів у тканині і від наявності/відсутності патологічного процесу; екзогенний гомоцистеїн, який *ex vivo* імітує гіпергомоцистеїнемію, знижує проліферативний індекс і підвищує апоптотичний індекс в плацентарних експлантах і активує цистатіонін- $\beta$ -синтазу. Молекулярні засади такого впливу гіпергомоцистеїнемії на процеси в плаценті невідомі, що робить їх дослідження своєчасним і важливим.

Ми поставили за мету дізнатися як змінюється в плаценті впродовж фізіологічної гестації експресія генів, які кодують ензими фолат-залежного метаболізму, і як гіпергомоцистеїнемія впливає на показники фолатного і метіонінового циклів і пов'язаних з ними процесів транссульфування і глутатіонового циклу. Для відповіді на перше питання ми застосували традиційні методи молекулярної біології (зворотну транскрипцію і полімеразну ланцюгову реакцію). Для відповіді на друге питання ми звернулись до стехіометричного моделювання фолат-залежного процесу в плаценті людини і врахували тканинспецифічні особливості експресії генів. Стехіометрична модель є найбільш вдалим компромісом між кількістю необхідних початкових даних для моделювання і прогностичним потенціалом моделі. Вона була вперше застосована в цій роботі для аналізу фолат-залежного метаболізму в плаценті людини за умов помірної гіпергомоцистеїнемії і поширеної в Україні, як і серед європейської популяції, С677Т мутантної форми метилентетрагідрофолатредуктази. Передбачені моделюванням під впливом помірної гіпергомоцистеїнемії зниження у синтезі

пуринів і підвищення в утворенні S-аденозилметіоніну і S-аденозилгомоцистеїну були перевірені і підтверджені в експерименті з плацентарними експлантами.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дослідження проводили в рамках бюджетного тематичного плану відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Геном людини» (шифр теми № 2.2.4.9) і за підтримки гранту Президента України для обдарованої молоді «Моделювання фолат-залежного метаболізму в плаценті людини» (2013 р.).

### **Мета та завдання дослідження**

**Мета:** 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 гіпергомоцистеїнемія і поліморфізм гена *MTHFR* на фолат-залежні процеси

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Проаналізувати експресію генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини впродовж гестації за даними літератури і Human protein atlas
2. Обрати реакції для реконструкції стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму в плаценті людини з урахуванням тканиноспецифічних особливостей експресії генів
3. Створити стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини і охарактеризувати фолат-залежні процеси за даними моделі
4. *In silico* симулювати гіпергомоцистеїнемію і визначити її вплив на фолат-залежні процеси
5. *In silico* симулювати мутацію C677T у гені *MTHFR* і визначити її вплив

на фолат-залежні процеси

6. *In silico* симулювати мутацію С677Т у гені *MTHFR* і гіпергомоцистеїнемію і визначити їх вплив на фолат-залежні процеси
7. Провести симуляцію гіпергомоцистеїнемії в експерименті і визначити її наслідки для життєво важливих процесів синтезу пуринів, S-аденозилметіоніну і S-аденозилгомоцистеїну і метилювання

*Об'єкт дослідження* - фолат-залежний метаболізм у плаценті людини.

*Предмет дослідження* – експресія генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини впродовж гестації; стехіометрична модель фолат-залежного метаболізму; вміст S-аденозилметіоніну, S-аденозилгомоцистеїну і синтез пуринів *de novo* за фізіологічних умов та при навантаженні гомоцистеїном

**Методи дослідження.** Біоінформатичні методи: стехіометричне моделювання метаболізму, аналіз елементарних мод, топології мережі, ключових метаболітів і балансу метаболічних потоків. Молекулярно-біологічні методи: культивування клітин і плацентарних експлантів, реакція зворотної транскрипції і ланцюгової полімеризації у реальному часі, вестерн-блот аналіз. Аналітичні методи: високоефективна рідинна хроматографія/мас-спектрометрія. Статистичні методи обробки даних.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Вперше охарактеризовано експресію генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини на першому і третьому триместрах гестації. Вперше створено стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини з урахуванням тканиноспецифічних особливостей експресії генів, проведено *in silico* симуляцію помірної гіпергомоцистеїнемії і С677Т мутації в гені *MTHFR*. За даними моделі визначено вплив кожного з факторів і сумісної дії обох факторів на фолат- залежні процеси. Вперше визначено синтез пуринів *de novo* в плаценті, його зміну протягом вагітності та під

впливом підвищеної концентрації гомоцистеїну, яка імітує гіпергомоцистеїнемію. Вперше оцінено вміст S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну в плаценті і зміну цих показників у плацентарних експлантах у відповідь на підвищену концентрацію гомоцистеїну, яка імітує гіпергомоцистеїнемію. Вперше зміни у метаболічних потоках, передбачені на основі симуляції помірної гіпергомоцистеїнемії і C677T мутації в гені *MTHFR* у стехіометричній моделі фолат-залежного метаболізму, були підтверджені в експерименті з плацентарними експлантами.

### **Практичне значення одержаних результатів.**

Створена стехіометрична модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини при певному доопрацюванні може бути використана для оцінки ризику виникнення ускладнень вагітності під впливом дії екзогенних (дієта, прийом лікарських засобів) і ендогенних (поліморфізм генів, що кодують ензими) факторів. Розроблені методи визначення синтезу пуринів *de novo* і вмісту S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну можуть бути використані в лабораторній практиці, зокрема в дослідженнях цитотоксичності і ефективності нових лікарських засобів, включно цитостатичні і протипухлинні препарати.

### **Особистий внесок здобувача.**

Основний обсяг експериментальної роботи, обробка та аналіз здобутих результатів виконані особисто здобувачем. Постановку наукових завдань та формулювання висновків дисертаційної роботи здійснено під керівництвом професора, доктора біологічних наук, керівника групи системної біології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України М. Ю. Оболенської.

Автором особисто створена комп'ютерна модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини. Симуляція моделі за різних умов виконана

спільно зі студентом Національного Університету “Києво-Могилянська Академія” І. С. Лушиком. Здобувачем також особисто виконано культивування експлантів плаценти людини, виділення ДНК та РНК, визначення експресії генів, задіяних у фолат-залежному метаболізмі, методом ЗТ-ПЛР в реальному часі. Культивування клітинної лінії MCF-7 виконано за допомогою Косач Вікторії Романівни, к.б.н., м.н.с. відділу сигнальних систем клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Високоєфективна рідинна хроматографія/мас-спектрометрія була виконана на базі Інституту гідробіології НАНУ у співпраці з Коновцем Ігорем Миколайовичем, к.б.н., завідувачем лабораторії біологічно активних сполук.

Здобувачем проаналізовані дані літератури та проведена обробка первинних результатів на трьох методичних напрямках дослідження. Обговорення отриманих результатів проводили спільно з науковим керівником та зі співвиконавцями роботи. Візуалізація даних була виконана спільно зі студентом КАУ Андрієм Костюком.

Збір зразків плаценти для дослідження виконано у співробітництві з пологовим будинком №3 м. Києва, Ірпінським пологовим будинком (Ірпінь, Україна) і гінекологічним відділенням міської лікарні №2 міста Києва. Протокол отримання плаценти та дозвіл на дослідження був затверджений Комітетом з етики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні положення роботи доповідалися на 4-й Міжнародній конференції ІМБГ для молодих вчених "Молекулярна Біологія: поступ і перспективи" (Київ, Україна, 2011 р.); 7-й щорічній міжнародній конференції Bridges in Life Sciences (Будапешт, Угорщина, 2012), 8-й щорічній міжнародній конференції Bridges in Life Sciences (Прага, Чеська Республіка, 2013), ІХ Міжнародній Науковій Конференції Студентів і Аспірантів “Молодь

і поступ біології” (Київ, Україна, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), 10-й Міжнародній Конференції X Parnas Conference (Вроцлав, Польща, 2016 р.).

### **Публікації.**

За темою дисертації опубліковано 5 експериментальних статей у провідних фахових виданнях, 2 оглядові статті та тези 7и доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації - 160 сторінок. Робота містить 10 рисунків, 18 таблиць, 1 додаток. Список використаної літератури охоплює 234 найменування, з них кирилицею - 3, латиницею - 229.

### 1.1 Фолат-залежні процеси - базові біохімічні процеси в клітині

Фолат-залежний метаболізм одноуглецевих фрагментів являє собою низку взаємозалежних реакцій, в яких похідні фолієвої кислоти виконують роль кофакторів і донорів одноуглецевих фрагментів груп (Рис. 1.1).

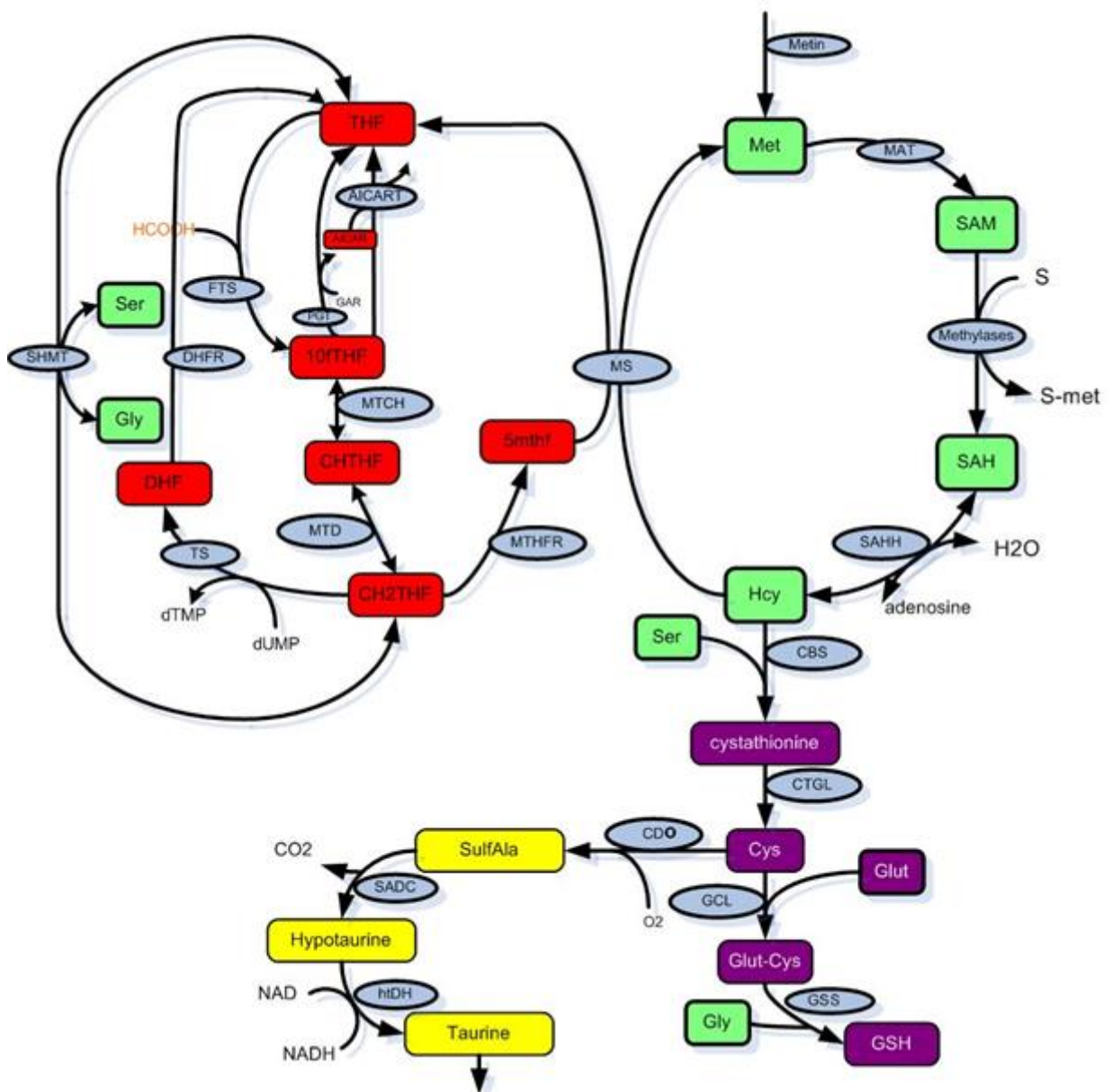


Рис. 1.1 Схема фолат-залежних процесів в плаценті людини.



Червоним кольором позначені метаболіти фолатного циклу, зеленим – амінокислоти, фіолетовим – метаболіти, що беруть участь в синтезі глутатіону, жовтим – метаболіти шляху синтезу таурину, а в блакитних овалах - назви реакцій за аббревіатурою ензимів.

**Ензими:** *AICART* – фосфорибозиламіноімідазол-карбоксамід формілтрансфераза (англ. phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase, К.Ф. 2.1.2.3), *CBS* – цистатіонін-β-синтаза (англ. Cystathionine beta-synthase, К.Ф. 4.2.1.22), *CD* – цистеїндіоксигеназа (англ. Cysteine dioxygenase, К.Ф. 1.13.11.20), *CTGL* – цистатіонін-γ-ліаза (англ. Cystathionine gamma-lyase, К.Ф. 4.4.1.1), *DHFR* – дигідрофолатредуктаза, (англ. Dihydrofolate reductase, К.Ф. 1.5.1.3), *FTS* – форміаттетрагідрофолат-синтетаза (англ. formate-tetrahydrofolate ligase, К.Ф. 6.3.4.3), *GCL* – глутамат-цистеїн лігаза (англ. Glutamate-cysteine ligase, К.Ф. 6.3.2.2), *GSS* – глутатіонсинтетаза (англ. Glutathione synthase, К.Ф. 6.3.2.3), *htDH* – гіпотаурин дегідрогеназа (англ. Hypotaaurine dehydrogenase, К.Ф. 1.8.1.3), *МАТ* – метіонін-аденозилтрансфераза, (англ. Methionine adenosyltransferase, К.Ф. 2.5.1.6), *Methylases* (МТ) – метилтрансферази, *Metin* – імпорт метіоніну, *MS* – метіонінсинтаза (англ. Methionine synthase, К.Ф. 2.1.1.13), *MTCH* – метенілтетрагідрофолат-циклогідролаза (англ. Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, К.Ф. 3.5.4.9), *MTD* – метилентетрагідрофолат-дегідрогеназа (англ. Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase, К.Ф. 1.5.1.5), *MTHFR* – метилентетрагідрофолат-редуктаза (англ. Methylene tetrahydrofolate reductase, К.Ф. 1.5.1.20), *PGT* – фосфорибозилгліцинамід-формілтрансфераза (англ. Phosphoribosylglycinamide formyltransferase, К.Ф. 2.1.2.2), *SADC* – сульфонілаланін-декарбоксілаза (англ. Sulfonilalanine decarboxylase, К.Ф. 4.1.1.29), *SAHH* – S-аденозилгомоцистеїн гідролаза (англ. Adenosylhomocysteinase, К.Ф. 3.3.1.1), *SHMT* – серингідроксиметилтрансфераза (англ. Glycine hydroxymethyltransferase, К.Ф. 2.1.2.1), *TS* – тимідилат синтаза (англ. Thymidylate synthase, К.Ф. 2.1.1.45).

**Метаболіти:** *5mTHF* – N5-метилтетрагідрофолат (CH<sub>3</sub>THF), *10fTHF* – N10-формілтетрагідрофолат (CHOTHF), *AICAR* – аміноімідазолкарбоксамід рибонуклеотид, *CH<sub>2</sub>THF* — N5,N10-метилентетрагідрофолат, *CHTHF* — N5,N10-метенілтетрагідрофолат, *Cys* – цистеїн, *Cystathionine* – цистатіонін, *DHF* – дигідрофолат, *dTMP* – деокситимідин монофосфат, *dUMP* – деоксиуридин монофосфат, *GAR* – гліцинамід рибонуклеотид, *Glut* – глутамат, *Glut-Cys* –  $\gamma$ -глутаміл цистеїн, *Gly* – гліцин, *GSH* – глутатіон, *Hcy* – гомоцистеїн, *Hypotaurine* – гіпотатурин, *Met* – метіонін, *S* – неметильований субстрат, *S-met* – метильований субстрат, *SAH* - S-аденозилгомоцистеїн, *SAM* - S-аденозилметіонін, *Ser* – серин, *SulfAla* – сульфонілаланін, *Taurine* – таурин, *THF* – тетрагідрофолат .

Фолат-залежні реакції необхідні для підтримання життєво важливих функцій клітини, а саме проліферації і експресії генів, мітохондріальної трансляції і утворення молекул-переносників енергії, переважної більшості реакцій метилювання тощо (6,14,15). Фолат-залежний метаболізм розподілений по трьох компартментах клітини: ядро, цитозоль і мітохондрії (16).

**1.1.1 Метіоніновий і тетрагідрофолатний цикли.** В центрі системи фолат-залежного метаболізму — метіоніновий і тетрагідрофолатний цикли. У першому метіонін з'єднується через атом сульфуру з аденозином із затратою АТР (аденозинтрифосфат). Внаслідок цієї реакції, каталізованої ензимом метіонін-аденозилтрансферазою (МАТ ЕС 2.5.1.6), утворюється універсальний донор метильних груп для переважної більшості реакцій метилювання в клітині – S-аденозилметіонін (SAM). Вважається, що реакція МАТ є швидкість-лімітуючою для всього метіонінового циклу (17). У ссавців ензим формується каталітичними субодинамиціями, що кодуються двома різними генами, *MAT1A* і *MAT2A*, і регуляторною субодинамицею, яку кодує ген *MAT2B*. У різних тканинах превалюють різні ізоформи ензиму, що

відрізняються як за складом субодиноць так і за кінетичними характеристиками. У більшості тканин, в тому числі в плаценті, активною є МАТІІ. Вона формується як гетероолігомер з двох бета і двох альфа-2 субодиноць. Відомо, що МАТІІ виявляє негативну кооперативність зв'язування метіоніну, але завдяки присутності регуляторної субодиноці ізоформа має найнижчу  $K_m$  (константу Міхаеліса) ( $\sim 30$  мкМ) до метіоніну серед свого сімейства ізозимів, та при цьому сильніше інгібується продуктом SAM. Ізоформа МАТІ - це тетрамер каталітичних субодиноць. Також описана ізоформа МАТІІІ: вона утворюється димером каталітичних субодиноць. Порівняно з МАТІІ, МАТІ і ІІ мають значно меншу спорідненість до метіоніну, відповідно, вищі  $K_m$ , оскільки не містять регуляторної субодиноці, а лише каталітичні альфа-1. МАТІ і МАТІІІ зазвичай, працюють в парі та експресуються в печінці. Зміни у співвідношення ізоформ І/ІІІ в клітині, а також їх заміна на ізоформу ІІ пов'язані з онкологічними захворюваннями та цирозом печінки (17). Вважається, що МАТІ і МАТІІІ в печінці формують систему, що збалансовує роботу метіонінового циклу і може відповідати на різкі зміни концентрації метіоніну. МАТІ інгібується метіоніном в той час, як МАТІІІ навпаки, ним активується і це дозволяє швидко переробляти великі кількості метіоніну, що надходять, наприклад, після прийому їжі, і також швидко повертатися до базального рівня активності при голодуванні (18).

SAMом, як універсальним кофактором, послуговуються більшість метилаз, зокрема, метилази ДНК, гістонів і РНК. Реакції метилювання за участі SAM унікальні для біологічних систем, оскільки вони єдині, в результаті яких звільняються всі три фосфатні залишки АТФ. SAM в ході реакції перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн (SAH) (19). Відношення вмісту SAM/SAH називають індексом метилювання.

Реакції метилювання відбуваються в значних об'ємах, особливо в організмі, що розвивається, і можуть споживати значну частину добового раціону метіоніну. В літературі найчастіше обговорюється метилювання ДНК,

через його вплив на експресію генів. Метилування так званих CpG-острівців в промоторній ділянці гена забезпечує зниження, чи повне «вимкнення» його експресії.

Утім, метилування нуклеїнових кислот в кількісному відношенні складає лише невелику частку порівняно з реакціями метилування гліцину та утворення креатиніну і фосфатидилхоліну. Перша працює як захисна реакція від перевантаження метіоніном, забезпечуючи його швидку переробку. В експериментах було показано, що надлишковий метіонін у раціоні спричиняє підвищення експресії гліцин-н-метилтрансферази (GNMT, К.Ф. 2.1.1.20) та кількості SAM і стабілізує рівень ендogenous метіоніну (20).

Метіонін-аденозил трансфераза конвертує метіонін в універсальний донор метильних груп, S-аденозилметіонін, який окрім численних реакцій метилування витрачається на синтез поліамінів. (за деякими даними близько 15 %). На шляху синтезу поліамінів SAM піддається декарбоксілюванню за участі ключового ензиму синтезу поліамінів, S-аденозилметіонін декарбоксилази (SAMdc, EC: 4.1.1.50), яка каталізує утворення S-аденозил-1-(метилтіо)-3-пропіламіну, що є донором амінопропільної групи для синтезу спермідину із путресцину і сперміну із спермідине. Функції цих сполук вкрай важливі на ранніх етапах ембріогенезу, плацентації, ангіогенезу і розвитку плоду. Гени, причетні до синтезу поліамінів, активно експресуються в матці на ранньому етапі ембріогенезу; в плаценті їх експресія підвищується від 20-го до 40-го дня гестації і спадає до 90-го дня (22, 197, 231).

Через свою структурну подібність до SAM, S-АН інгібує активність метилтрансфераз (21,22). Для запобігання інгібуванню реакцій метилування S-АН швидко гідролізується до аденозину і гомоцистеїну за допомогою S-АН-гідролази (EC 3.3.1.1). Це оборотна реакція, що перебуває у динамічній рівновазі і в нормі зміщена в бік утворення гомоцистеїну і такий напрям підтримується лише завдяки швидкій елімінації продуктів реакції (17). Втім, рівновага може зсунути у протилежному напрямку як надлишком

гомоцистеїну, так і пуринових азотистих основ (23,24).

Основний продукт реакції - гомоцистеїн. Це токсична високореактивна амінокислота, що має бути швидко утилізована. Саме він стоїть на перетині метіонінового циклу і транссульфування. У метіоніновому циклі реметилування гомоцистеїну каталізується метіонінсинтазою (MS, 5-метилтетрагідрофолат-гомоцистеїн-S- метилтрансфераза, EC 2.1.1.13), яка є зв'язуючою ланкою між метіоніновим і тетрагідрофолатним циклами. Метіонінсинтаза — єдиний ензим, який використовує 5-метилтетрагідрофолат в якості субстрату і перетворює його на тетрагідрофолат в реакції реметилування гомоцистеїну. Метіонінсинтаза використовує вітамін B<sub>12</sub> (кобаламін) в якості кофактора. Кобаламін забирає метильну групу у метилтетрагідрофолату, перетворюючись на метилкобаламін. Потім в ході метіонінсинтазної реакції відбувається перенесення метильної групи від метилкобаламіну на гомоцистеїн з утворенням кобаламіну і метіоніну. Показано, що і кобаламін і метилкобаламін безпосередньо зв'язані з ензимом (25–27).

Активність метіонінсинтази практично припиняється після ~1000-2000 обертів ензиму внаслідок одно-електронного окиснення кобаламіну. Відновлює роботу ензиму редуктаза метіонінсинтази (MTRR, EC 2.1.1.135) з використанням НАДН і метильної групи від S-аденозилметіоніну (25).

Порушення роботи метіонінсинтази може призводити до накопичення 5-метилтетрагідрофолату (5-mTHF) на шкоду іншим формам фолатів, що призводить до їх дефіциту, утворюється так звана «фолатна пастка» (28). Реметилування гомоцистеїну є однією з життєво важливих реакцій, а метіонінсинтаза представлена в різних тканинах, включаючи плаценту (27,29).

Необхідний для роботи метіонінсинтази субстрат, 5-mTHF, утворюється з 5,10-метилентетрагідрофолат (CH<sub>2</sub>THF) за допомогою рибофлавін (вітамін B<sub>2</sub>)-залежного фермента метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR), яка конкурує за CH<sub>2</sub>THF із шляхом синтезу попередників нуклеїнових кислот.

Функціонування МТНFR має велике значення для регулювання доступності 5-mTHF для реметилювання гомоцистеїну. Інгібітором МТНFR виступає SAM (28).

В організмі людини також існує альтернативний шлях перетворення гомоцистеїну на метіонін за рахунок роботи бетаїн-гомоцистеїн-S-метилтрансферази (EC 2.1.1.5), яка функціонує в печінці і нирках (30).

Тетрагідрофолат (THF) отриманий після реметилювання гомоцистеїну метіонінсинтазою може бути безпосередньо перетворений в CH<sub>2</sub>THF під дією серингідроксиметилтрансферази (SHMT) (EC 2.1.2.1). SHMT - вітамін B6-залежний ензим, що використовує серин, як донора метильної групи. В організмі людини SHMT має цитозольну і мітохондріальну ізоформи (31). Раніше було показано, що серин є основним джерелом одновуглецевих груп для цитоплазматичного одновуглецевого метаболізму (6), в основному за рахунок його конверсії у форміат в мітохондріях (16,32,33). Дослідження останніх років показали важливу роль мітохондріального компартменту фолат-залежного метаболізму: ензим гліцин-декарбоксилаза, яка працює в мітохондріях на декарбоксилювання гліцину, виступає важливим постачальником форміату — до 80% одновуглецевих фрагментів у фолат-залежного метаболізму. Мутації, які знижують активність гліцин-декарбоксилази, спричиняють дефіцит «активованих» форм фолатів, що несуть одновуглецеву групу, і призводять до незрощення нервової трубки в ембріонах мишей (34). Додавання форміату при неактивній гліцин-декарбоксилазі відновлює фолат-залежний синтез нуклеотидів і запобігає незрощенню нервової трубки (35). Приєднання форміату до неактивних форм фолатів, перетворення THF на CH<sub>2</sub>THF через 10-fTHF і СНТНF каталізується трифункціональним ензимом метилентетрагідрофолат дегідрогеназою (МТНFD1), який має активності формілтетрагідрофолат синтетази, метенілтетрагідрофолат циклогідролази і метилентетрагідрофолат дегідрогенази (36). 10-fTHF надає одновуглецеві групи для біосинтезу

пуринів, тоді як 5,10-метилентетрагідрофолат використовується як кофактор для конверсії деоксиуридину монофосфату (dUMP) у тимідилат монофосфат. Ця реакція каталізується тимідилатсинтазою (TYMS) (EC 2.1.1.45) і продукує дигідрофолат (DHF), який відновлюється до тетрагідрофолату дигідрофолатредуктазою (DHFR) (EC 1.5.1.3).

Таким чином, фолатний цикл тісно пов'язаний з синтезом попередників нуклеїнових кислот — пуринів і піримідинів. Якщо кількість фолатів обмежена, то накопичується dUMP, через дефіцит ключового донору метильних груп — 5,10-метилентетрагідрофолату для перетворення dUMP у тимідилат ензимом тимідилатсинтазою. Тимідилатсинтаза може бути особливо чутлива до нестачі фолатів, оскільки за останніми даними вона локалізується в ядрі, безпосередньо на виделці реплікації, куди фолатні кофактори ще необхідно транспортувати (37). Як наслідок, відбувається надмірне включення урацилу в ДНК замість тиміну. Такий дефект за нормальних умов виправляється ензимом урацил-ДНК-глікозилазою, що видаляє урацил з ланцюжка ДНК, але надмірні репарації включень урацилу в ДНК на відстані менше ніж 12 пар нуклеотидів одне від одного можуть призвести до нестабільності хромосом через порушення структури і суперспіралізації ДНК. Такі порушення збільшують схильність клітин до злоякісних трансформацій (38).

Пуринові нуклеотиди і пов'язані з ними фосфорильовані метаболіти виконують численні важливі функції у біологічних системах. Вони є попередниками в синтезі нуклеїнових кислот і незамінні для реплікації і репарації та транскрипції ДНК і РНК. АТФ і гуанозинтрифосфат (GTP) - це енергоносії; похідні пуринових нуклеотидів - коензими (коензими А, NAD, NADP і FAD) і регулятори в клітинному метаболізмі (сАМР і сGMP); вони є сигнальними молекулами, що діють через пуринергічні рецептори окрім звичайного механізму зміщення рівноваги реакції за законом діючих мас (39–41).

Нещодавно було виявлено двосторонній регуляторний зв'язок між кількістю пуринових нуклеотидів і активністю комплексу mTORC1, який функціонує як поживний/енергетичний/окисно-відновний сенсор (42,43). Рівень активності біосинтезу пуринів модулює імунні реакції і регулює експресію глікопротеїну клітинної поверхні головного комплексу гістосумісності, який розпізнається імунними клітинами і бере участь у контролі ауто толерантності або її втрати (44,45).

Також у нещодавніх дослідженнях було показано, що mTORC виступає ще і сенсором рівня фолатів в клітині, що засвідчує існування зв'язку між рівнем фолатів і регуляцією росту і функціонування клітини (46).

Фолати не тільки виступають кофакторами в реакції утворення тимідилату і синтезу пуринового кільця, куди вони поставляють два атоми вуглецю, але й задіяні в синтезі пуринів через ензим SHMT, який забезпечує пуринове кільце будівельним матеріалом — гліцином з серину і одночасно утворює 5,10-метилентетрагідрофолат, який надалі формує формілтетрагідрофолат, що теж використовується в пуриновому синтезі (47). Таким чином, з 10 реакцій синтезу пуринів *de novo* три пов'язані з тетрагідрофолатним циклом. Під час активної проліферації та росту, що потребує більш високого рівня пуринів, внутрішньоклітинний попит на пурини задовольняється шляхом активації шляху біосинтезу *de novo*. Шлях синтезу *de novo* - це консервативний і енергоємний процес. Він використовує п'ять молекул АТР, по дві молекули глутаміну та 10-формілтетрагідрофолату та по одній молекулі гліцину, аспартату та двоокису вуглецю на кожну утворену молекулу інозину монофосфату (ІМР), спільного попередника АТР і GTP (40,48,49).

Глутамін та аспартат утворюються з проміжних сполук циклу трикарбонових кислот; гліцин та форміат надходять із фолат-залежного катаболізму серину та гліцину в мітохондріях і цитоплазмі (40,45,49,50).

### **1.1.2 Процеси транссульфування.** Окрім метіонінового та фолатного



циклів і залежних від них шляхів синтезу попередників нуклеотидів і процесів метилювання фолат-залежний метаболізм пов'язаний через гомоцистеїн з іншими метаболічними шляхами. Гомоцистеїн майже порівну розподіляється між процесом реметилювання і транссульфуванням до цистеїну (51). В процесі транссульфування гомоцистеїн перетворюється на цистатіонін і цистеїн за участю цистатіонін- $\beta$ -синтази (ЕС 4.2.1.22) і піридоксальфосфату (рис.1.1) (52). У процесі транссульфування гомоцистеїн конденсується із серином з утворенням цистатіоніну. За фізіологічних умов ця реакція практично необоротна. Потреба в серині для роботи цистатіонін- $\beta$ -синтази робить доступність цієї амінокислоти лімітуючим фактором для синтезу цистеїну і утилізації гомоцистеїну при незбалансованому харчуванні, наприклад, надмірність метіоніну в їжі (53). Цікаво, що цистатіонін- $\beta$ -синтаза має на порядок нижчу спорідненість ( $K_m$ ) до гомоцистеїну, ніж метіонінсинтаза, зате значно вищу швидкість роботи. Це слугує своєрідним перемикачем: за низьких концентрацій гомоцистеїну переважно реметилюється в метіонін, а за високих «вмикається» транссульфування.

Ці перетворення контролюються рівнем SAM, який виконує роль як алостеричного інгібітора метилтетрагідрофолатредуктази і бетаїн-гомоцистеїн-S-метилтрансферази, так і активатора цистатіонін- $\beta$ -синтази. Такі його властивості забезпечують координацію шляхів реметилювання та транссульфування гомоцистеїну.

Низькі концентрації SAM, які не гальмують синтез 5-метилтетрагідрофолату, спрямовують метаболізм Hcy у бік утворення метіоніну. Навпаки, високий рівень SAM пригнічує синтез 5-метилтетрагідрофолату і одночасно активує синтез цистатіоніну і забезпечує елімінацію гомоцистеїну шляхом транссульфування (54,55). Властивість SAM стабілізувати ензим цистатіонін- $\beta$ -синтазу визначає його здатність модулювати антиоксидантні властивості клітини, оскільки більшість цистеїну конвертується в глутатіон і таурин (56).

Порушення функціонування цистатіонін- $\beta$ -синтази викликають акумулювання гомоцистеїну, сприяють експорту його з клітини, що призводить до гіпергомоцистеїнемії і до гомоцистеїнурії — накопичення гомоцистеїну відповідно в крові і сечі (57).

Утворений цистатіонін- $\beta$ -синтазою цистатіонін розщеплюється  $V_6$ -залежним ензимом — цистатіонін- $\gamma$ -ліазою (CSE, EC 4.4.1.1) (також CTGL, CTH) — до цистеїну, аміаку та  $\alpha$ -кетобутирату. Цистеїн використовується для синтезу білка, утворення глутатіону, біосинтезу коензиму А і таурину, а також сульфату в процесі свого катаболізму (10,58). Транссульфування відіграє суттєву роль в усуненні потенційно небезпечного надлишку гомоцистеїну, хоча працює лише в деяких тканинах ссавців (52,53,59,60).

Розглянемо два шляхи катаболізму цистеїну, які споживають основну його масу: окиснення з подальшим синтезом таурину і синтез глутатіону з цистеїну.

Цитозольний ензим цистеїн-діоксигеназа (EC 1.13.11.20) каталізує необоротну реакцію окиснення цистеїну до цистеїнсульфіату. Ця реакція є необхідною для багатьох важливих метаболічних перетворень. По-перше, відбувається утилізація цистеїну, по-друге, синтезований в ході реакції цистеїнсульфіат надалі метаболізується по двох основних шляхах: перетворення в низці реакцій на таурин або ж катаболізм до пірувату і сульфату. Такі продукти сульфоокиснення цистеїну чинять на організм набагато м'якший вплив з точки зору цитотоксичності, ніж сам цистеїн (58,61).

Регуляція обох шляхів перетворення цистеїнсульфіату здійснюється в основному на рівні цистеїн-діоксигенази. Активність цистеїн-діоксигенази регулюється в залежності від надходження цистеїну до клітин і може зростати в 45 разів, а її каталітична активність — в 10 разів при його надмірному надходженні. Таке різке збільшення концентрації ензиму пов'язане з

блокуванням його протеасомної деградації. Активність цистеїн-діоксигенази регулюється концентрацією цистеїну за рахунок того, що між двома амінокислотними залишками цистеїну-93 і тирозину-157 утворюється тіоефірний зв'язок і при цьому зростає каталітична активність ензиму (10,62,63).

Експресія цистеїн-діоксигенази є тканиноспецифічною, у людини мРНК цього гена визначається лише в деяких типах тканин. Найвищий рівень мРНК спостерігається у печінці та плаценті, наступними за ними йдуть мозок, серце і підшлункова залоза (64).

Цистеїнсульфінат, що утворюється цистеїн-діоксигеназою, в подальшому декарбоксилюється піридоксальфосфат-залежним ензимом цистеїнсульфінат-декарбоксилазою (CSAD, EC 4.1.1.29) з утворенням гіпотаурину, або перетворюється на піруват і сульфід за участі аспаратамінотрансферази (EC 2.6.1.1). Гіпотаурин в наступній спонтанній реакції окислюється до таурину, хоча деталі цього перетворення у живих організмах мало досліджені. Існує думка, що цистеїнсульфінат-декарбоксилаза є швидкість-лімітуючим ензимом у шляху біосинтезу таурину (10,65).

### **1.1.3 Зв'язок між транссульфуванням і синтезом глутатіону.**

Утворення  $\gamma$ -глутамілцистеїну є першим етапом в процесі синтезу глутатіону. Ця реакція каталізується ензимом глутамат-цистеїн лігазою (GCL, EC 6.3.2.2), який являє собою гетеродимерний білок, утворений каталітичною (GCLc), масою 73 кДа, та модифікуючою (GCLm), масою 31 кДа, субодиницями, які у ссавців кодуються окремими генами. Вся ензиматична активність проявляється у каталітичній субодиниці і у вигляді мономеру, проте приєднання модифікуючої субодиниці змінює її кінетичні властивості, що проявляється у загальному зростанні активності GCL. В подальшому до  $\gamma$ -глутамілцистеїну приєднується гліцин. Це другий етап синтезу глутатіону,

який каталізується глутатіон синтетазою (EC 6.3.2.3) (32,66–69).

Глутатіон ( $\gamma$ -глутамілцистеїнілглутамін, GSH) – найбільш розповсюджений небілковий тіол в тканинах ссавців. Глутатіон відіграє надзвичайно важливу роль в антиоксидантних та окисно-відновних процесах за рахунок перебування у тіольній/відновленій (GSH) та у дисульфідній/окисненій (GSSG) формах. Домінуючою в клітині є відновлена форма (GSH), яка складає більше 98% всього пулу глутатіону. Він функціонує в якості обов'язкового коензиму чи косубстрату в багатьох реакціях, включаючи реакції кон'югації, залучені у детоксикації. Глутатіон також бере участь у  $\gamma$ -глутамільному циклі, завдяки якому амінокислоти транспортуються всередину клітини, та у клітинному сигналінгу за рахунок S-глутатіонування та S-нітрозилювання залишків цистеїну у білках. Крім того, глутатіон слугує своєрідним резервом амінокислоти цистеїн, що використовується при зменшенні рівня споживання сульфовмісних амінокислот (10,68,70).

## **1.2 Поліморфізм генів, залучених до фолат-залежного метаболізму**

Фолат-залежні процеси визначаються високою частотою поліморфізмів генів, що кодують відповідні ензими.

Експресія тимідилатсинтази модулюється енансерною послідовністю гена в 5'-UTR області (TSER), а саме унікальними тандемними повторюваними послідовностями і поліморфізмами, що знаходяться в 3'-UTR (TS1494del6b) області гена. *TYMS* має приблизно 5892 поліморфізмів, з яких 1078 - делеції, 5 - множинні заміни нуклеотидів, 398 - дуплікації, і 4411 — однуклеотидні поліморфізми. Найчастіше присутній варіант регіону TSER - це подвійні (2R) і трикратні (3R) повторювані послідовності, хоча 4R, 5R і 9R трапляються також. 3R послідовності показують більш високу ефективність трансляції, ніж 2R послідовності. Гомозиготи 3R/3R показують більш високу експресію білка *TYMS* і вищу активність ензиму. Другий функціонально ідентифікований поліморфізм *TYMS* - це делеція / інсерція на 6 п.н. при 1494 п.н. в 3'-UTR гена

TYMS. (38).

Найчастіше в літературі обговорюються поліморфізми гена *MTHFR*, який кодує метилентетрагідрофолатредуктазу. *MTHFR* — один з найбільш вивчених ензимів фолатного циклу, його поліморфізми асоціюються зі ступенем ризику виникнення розладів вагітності, незарощення нервової трубки тощо (4,71). *MTHFR* нараховує приблизно 6375 поліморфізмів, що складаються з 650 делецій, 5 багаторазових заміщень нуклеотидів, 140 дуплікацій і 5580 SNP. Два найпоширеніші поліморфізми, 677C->T заміна при кодоні 222 (Ala222Val) і 1298A->C заміна в кодоні 429 (Glu429Ala) були пов'язані з різними типами раку. На додаток до 677C->T і 1298A->C існує третій поліморфізм, 1793G->A, частота якого низька (приблизно 4.6% або менше) і який асоційований з колоректальним раком (77). Поліморфізм 677C->T впливає на каталітичну активність білка, а поліморфізм 1298A>C впливає на його регуляторну функцію (72). Гомозиготи 677 CC зустрічаються в популяції частіше (приблизно 60%), ніж гетерозиготи 677 CT (приблизно 31%), але у випадку замін у 1298 положенні 1298AC зустрічається частіше (приблизно 53%), ніж 1298AA (приблизно 31%). Виявлено, що 677TT і 1298CC гомозиготи мають знижений ризик раку простати, 9 і 11% відповідно (38). Поширена мутація С677Т зумовлює появу термолабільної ізоформи зі зниженою каталітичною активністю, яка дорівнює 65 і 30 % за носійства відповідно С677Т та Т677Т алелів у порівнянні зі 100 % активністю за носійства С677С алельних варіантів *MTHFR*. Більше того, у осіб, що є носіями мутантних Т677Т гомозигот, спостерігали зміни у співвідношенні фолатів в еритроцитах зі зниженням вмісту 5-метилТНФ та акумулюванням формільних форм тетрагідрофолатполіглутаматів (73). Частота такої мутації в різних популяціях складає від 7% до 40%. В Україні - близько 50 %. (71). Інша поширена мутація в гені *MTHFR*, – А1298С, зустрічається в популяціях з частотою 20% (74).

Дослідження *MTHFR*-нокаутних мишей показали, що в їх мозку у 10

разів вищий рівень гомоцистеїну, знижений рівень 5-метилтетрагідрофолату і SAM та підвищений рівень SAH, а рівень загальних фолатів у плазмі крові складав лише 25 % від рівня у мишей дикого типу *MTHFR*<sup>+/+</sup>. Це призводило до гіпометилування ДНК і викликало зміни в експресії генів. Експерименти також показали, що у гетерозиготних і гомозиготних нокаутних мишей по гену *MTHFR* спостерігається підвищений рівень гомоцистеїну у плазмі крові, низький рівень SAM та підвищений SAH. Дослідники спостерігали порушення процесів метилування і дисбаланс ліпідів в аорті мишей (73).

Як було описано вище, ключовий ензим, який забезпечує транссульфування гомоцистеїну — цистатіонін-β-синтаза. Ген, що кодує ензим цистатіонін-β-синтазу поліморфний, і його варіант з вісімнадцятьма тандемними повторами ділянки в 31 п.н. (31bp VNTR) на межі 13-го екзону і 13-го інтрону зустрічається у 60% представників європейської популяції, а ензим має знижену на приблизно 38% ензиматичну активність (75). Зустрічаються й інші заміни в гені *CBS*, які супроводжуються зниженням ензиматичної активності, наприклад, T833C поліморфізм в *cis* положенні з інсерцією 68 п.н. в районі 844 нуклеотида у 8-му екзоні (76).

### **1.3 Вплив гомоцистеїну на клітинні процеси**

Маркером стану фолат-залежного метаболізму виступає рівень гомоцистеїну, вміст якого часто підвищений в контексті захворювань серцево-судинної, нервової системи та акушерських патологій, пов'язаних з порушеннями функціонування плаценти (77–80). Через тісний зв'язок між фолатним і метіоніновим циклами, багато факторів, які впливають на рівень фолатів, також впливають і на рівень гомоцистеїну. Наприклад, дієти, бідні на фолієву кислоту, кобаламін та вітамін B6 (81), а також застосування препаратів-антагоністів фолатів, включаючи антиконвульсивні та інші нейрорепаранти (82), які безпосередньо підвищують рівень гомоцистеїну.

В свою чергу препарати, що підвищують рівень гомоцистеїну

(наприклад, проносні, діуретики, протизапідні засоби, протизапальні та іммуносупресори) також знижують рівень фолієвої кислоти (83–86).

Дослідження показують, що підвищені рівні гомоцистеїну призводять до прискорення проліферації у клітинній лінії Caco-2. Така прискорена проліферація може бути зупинена додаванням у культуральне середовище фолатів (38). Нині дані літератури щодо впливу гомоцистеїну на проліферативні процеси в концентраціях, які спостерігаються у клінічній практиці, свідчать про клітинно-специфічний характер його дії. Згідно з численними даними, гомоцистеїн активує проліферацію клітин гладеньких м'язів судин, зірчатих клітин печінки та клітин мікроглії, тобто клітин мезодермального походження. У клітинах ентодермального походження гомоцистеїн, навпаки, пригнічує проліферацію, зокрема в попередниках нейронів і в ендотелії судин. Здатність гомоцистеїну інгібувати проліферацію ендотеліальних клітин пов'язують з інактивацією екстрацелюлярної сигнально-регуляторної кінази Erk 1/2 пригніченням Erk 1/2-залежної експресії цикліну E, метилюванням p21 gas, супресією транскрипції цикліну A через зниження активності метилтрансферази I та деметилювання промотору цикліну A (13).

Загалом гіпергомоцистеїнемія впливає на широке коло процесів: інгібування метаболізму глюкози, амінокислотного та білкового обміну, шляхів реагування на окислювальний стрес та метаболізм ліпідів. В той же час активуються обмін ліпопротеїнів, енергетичний та білковий обмін.

Зміни експресії генів, спричинені гіпергомоцистеїнемією, включають епігенетичні механізми: метилювання ДНК та модифікацію гістонів, включаючи ацетилювання, метилювання та приєднання гомоцистеїну.

Гомоцистеїн модулює експресію генів, задіяних у багатьох сигнальних та метаболічних шляхах. Серед них, власне, гени, що кодують ензими фолат-залежного метаболізму і реакцій транссульфування, сигнальні шляхи проліферації, апоптозу, відповіді на оксидативний стрес та інші.

Гомоцистеїн активує експресію протеїну P66shc, який регулює відповідь на оксидативний стрес і активує апоптоз в ендотеліальних клітинах пуповинної вени (87). Гомоцистеїн чинить вплив й опосередковано через активацію специфічних некодуєчих РНК: мікроРНК, довгих некодуєчих РНК та циклічних некодуєчих РНК. Наприклад, гіпергомоцистеїнемія, індукована у культивованих гладком'язових клітинах, а також *in vivo* у мишах, нокаутних по гену AroE, знижує експресію miR-125b, що підвищує рівень ДНК-метилтрансферази-3В. Це призводить до гіперметилування та зниження експресії гена TP53, тим самим сприяючи проліферації гладком'язових клітин. Ще одне дослідження показує, що гіпергомоцистеїнемія підвищує експресію ДНК-метилтрансферази-3А (мРНК та білок), збільшує метилування та знижує експресію гена miR-143 в гладком'язових клітинах (88).

Не можна виключити і токсичної дії самого гомоцистеїну, який теж здатний до автоокислення, але меншою мірою, ніж цистеїн, з утворенням активних радикалів кисню і пероксинітриту (14,89). Шкідлива дія гомоцистеїну і його похідних через активацію процесів їхнього окислення з наступним втягненням мітохондрій і подальшим розвитком апоптозу спостерігається в дослідях, проведених із первинними культурами цито- і синцитіотрофобластів (4,12).

Гомоцистеїн та гомоцистеїну тіолактон, як високореактивні сполуки, можуть утворювати аддукти з білками, деактивуючи їх та переводячи в неактивну форму (38).

#### **1.4 Значення фолат-залежних процесів для розвитку системи плацента-плід**

При вагітності потреба у фолатах різко зростає, а їх нестача асоціюється з багатьма патологіями вагітності: прееклампсія, анемія, внутрішньоутробна затримка росту, спонтанні аборти тощо (90). Препарати фолієвої кислоти призначають для запобігання мегалобластомній анемії при вагітності. Прийом



фолієвої кислоти до зачаття суттєво знижує ризик незрощення нервової трубки плода. З 1998 року продукти з борошна у США спеціально збагачуються фолієвою кислотою (91).

Фолат-залежний метаболізм забезпечує синтез нуклеотидів *de novo*, що особливо важливо при швидкому поділі клітин і активному рості плаценти і плода. Також від функціонування метіонінового циклу залежить доступність кофакторів для реакцій метилювання, в тому числі для метилювання ДНК, необхідного для регуляції експресії генів при ембріональному розвитку (6). Похідні від пов'язаного з фолатним циклом процесу транссульфування — глутатіон і таурин, також відіграють важливу роль у нормальному перебігу вагітності. Глутатіон захищає клітини від оксидативного стресу, запобігаючи мутаціям в клітинах на ранніх етапах розвитку та підтримує стабільний окисно-відновний потенціал (92). Таурин також працює як антиоксидант, але вважається що в основному він регулює осмотичний тиск і є нейротрансмітером. Під час вагітності таурин накопичується в материнських тканинах, вивільняючись в перинатальний період і транспортується до плоду через плаценту. Також в самій плаценті експресуються гени синтезу таурину. Він накопичується в основному в мозку плода та новонародженого. Таурин необхідний для нормального розвитку нервової системи і бета-клітин підшлункової залози плоду, нестача таурину спричиняє затримку розвитку (93–95).

Фолат-залежний метаболізм в системі плацента-плід має свої особливості, які необхідно враховувати для розуміння функціонування цієї системи. Так, наприклад, існують «човники» (англ. Shuttle) транспорту амінокислот між печінкою плода і плацентою, що обмінюють серин на гліцин та глутамат на глутамін (96). Фолати у формі 5-метилтетрагідрофолату поглинаються фолатним рецептором плаценти і можуть транспортуватися проти градієнту концентрації. На відміну від печінки деякі гени фолатного метаболізму в плаценті не експресуються. Крім того, численні гени —

поліморфні. Також працюють складні регуляторні системи на рівні взаємодії метаболіт-ензим та модифікації ензимів (5,97).

Усе це робить покрокове дослідження кожної варіації у системі плід-плацента фізично неможливим, а розуміння роботи системи у її цілісності — напрочуд складним. Для аналізу максимально можливої кількості варіацій фолат-залежного метаболізму і їх наслідків необхідно створити модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини, що надасть можливість симулювати будь-які зміни в системі і відслідковувати їх наслідки.

## **1.5 Плацента – орган, який забезпечує розвиток плоду і перебіг вагітності в організмі матері**

**1.5.1 Будова плаценти, її розвиток.** Плацента – це орган, що забезпечує постійний метаболічний зв'язок між організмом матері і плодом. Вона формує гематоплацентарний бар'єр і забезпечує живлення, постачання кисню плоду і виведення оксиду вуглецю та продуктів обміну плоду у кров матері, і таким чином забезпечує процеси росту і розвитку плоду та перебігу вагітності. Плацента виступає регулятором внутрішньоутробного середовища для плода та органом, чия функція необхідна для підтримання вагітності в організмі матері адже плацента виконує функції детоксикації, синтезу гормонів, імунної системи (98). Порушення у функціонуванні плаценти несприятливо впливають як на організм матері, так і на плід та призводять до обмеження його росту і розвитку (99).

Формування плаценти є складним процесом, що потребує скоординованого регулювання інвазії трофобласту і проліферації, а також диференціації в децидуальній оболонці матері (100,101).

Плацента ссавців має дві частини: материнську, утворену материнським, функціональним шаром ендометрія (децидуальна оболонка) і плодову, утворену хоріоном (похідним трофобласта) і амніоном (рис. 1.2) (102).

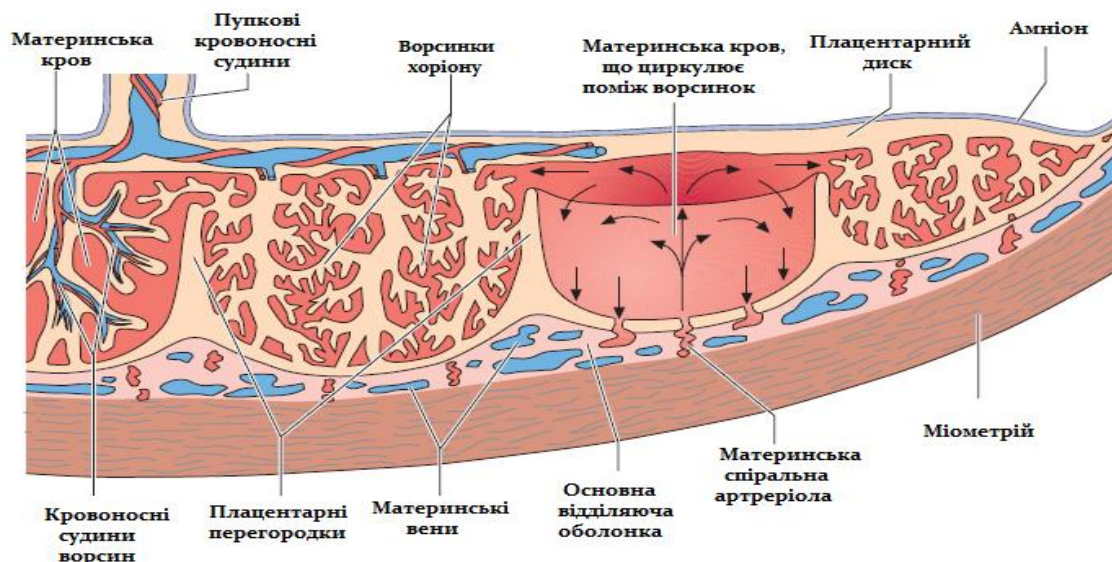


Рис. 1.2 Схематичне зображення плаценти людини за Faller et al. (Адаптовано до (103)).

На ранніх етапах вагітності в центральній області плодової частини плаценти формуються тонкі вирости, які згодом починають інтенсивно галузитись і утворюють структури, які називаються ворсинками хоріону. Ворсинки занурені в лакуни материнської частини плаценти і постійно омиваються кров'ю, що забезпечує належний транспорт речовин між матір'ю і плацентою (104). У людини у першому триместрі вагітності, ворсинки плаценти складаються з мезенхімних клітин, що оточені шаром клітин цитотрофобласту (внутрішній, клітинний шар трофобласту). В якірних ворсинках цитотрофобласт диференціюється у позаворсинковий трофобласт (105–107). Клітини цитотрофобласту зливаються і формують синцитіотрофобласт, зовнішній багатоядерний клітинний шар трофобласту. Синцитіотрофобласт – це спеціалізований епітелій, який знаходиться в контакті з материнською кров'ю і функціонує головним чином для двостороннього обміну газами і поживними речовинами та продуктами життєдіяльності (108). На початку вагітності цитотрофобласт, закріплюючись, проникає у материнську децидуальну оболонку і міометрій (м'язову оболонку). Позаворсинковий трофобласт росте з ворсинок у колони (тяжі трофобласту, які з'єднують сусідні ворсинки і закріплюють їх) і занурюється

у децидуальну оболонку, проникає у спіральні артерії, що веде до їх трансформації. Порушення нормальної інвазії трофобласту і ремоделювання судин веде до таких ускладнень вагітності, як прееклампсія, затримка росту плода, викидні (100,108–110). Хоча ворсинки хоріону зрештою мають омиватися материнською кров'ю в гемохоріальній плаценті, до 10 тижня приток материнської крові до плаценти заблокований пробкою з позаворсинкового трофобласту і розвиток плаценти і плоду забезпечується гістіотрофним живленням за рахунок залоз, які існують в едометрії (109). Зараз встановлено, що розвиток та зростання органів плоду протягом першого триместру вагітності відбуваються у фізіологічно гіпоксичному мікросередовищі, стимульованому виділеннями із залоз ендометрію, багатих поживними речовинами та факторами росту. До кінця першого триместру структура плаценти формується остаточно. Цей процес пов'язаний з початком артеріального кровообігу від матері до плаценти і опосередковується місцевим індукованим окислювальним стресом через супутнє підвищення концентрації кисню. Ці морфологічні зміни є відображенням мільйонів років адаптації до змін концентрації кисню в земній атмосфері (111).

**1.5.2 Фактори, що впливають на розвиток плаценти.** Розвиток плаценти протягом вагітності регулюється цілою низкою факторів, серед яких можна виділити генетичні фактори батьків, вплив з боку плоду і з боку материнського організму, зовнішні фактори довкілля тощо. Ріст і розвиток плоду потребує відповідних адаптивних змін у плаценті. Маса плаценти відповідає розмірам плоду, змінюючись відповідно до його росту, при цьому зростає і співвідношення мас між плацентою і плодом від 1:2,9 на 24 тижні вагітності до 1:6,8 у зрілій плаценті. Відбувається ряд морфологічних змін у плаценті, зокрема послідовна зміна різних типів хоріонічних ворсинок. Спостерігаються зміни у швидкості проліферації клітин та ангиогенезі (112). Кардинальні зміни, що відбуваються в плаценті протягом вагітності

вимагають відповідних молекулярних механізмів, так, із активних 12000 генів в плаценті людини, більше 7000 генів по-різному експресуються в першому і третьому триместрі. Ці зміни пов'язані з такими біологічними процесами як метаболізм нуклеїнових кислот, метаболізм і модифікація білків, транскрипція, клітинний цикл. Їх висока експресія в плаценті першого триместру відображає інтенсивний поділ і проліферацію клітин плаценти (112,113).

Накопичені дані свідчать про те, що навіть дієта матері здатна змінювати епігенетичний стан геному плода та експресію генів за допомогою імпринтингу. Плацента демонструє високу мінливість загального метилювання ДНК порівняно з іншими тканинами, ймовірно, у відповідь на її роль в опосередкуванні суперечливих потреб матері та плоду. Фенотип плаценти реагує на умови навколишнього середовища і його розуміння може допомогти передбачити ризик захворювання дорослих, запрограмованого внутрішньоутробно. Епігеном плаценти виступає не тільки як відображення впливу довкілля під час вагітності, але також є посередником та/або модулятором патогенезу захворювання (99).

### **1.5.3 Особливості фолат-залежного метаболізму в плаценті людини.**

Плацентарний фолат-залежний метаболізм має тканиноспецифічні ознаки й помітно різниться від такого в найбільш дослідженому органі — печінці. Так, приміром, при зміні надходження фолатів у печінці плода змінюють експресію 989 гени в той час як в плаценті — 460, але лише 25 з цих диференційно експресованих генів є спільними і для печінки і для плаценти (114). Потреби системи плацента-плід вимагають напруженої роботи різних ділянок метаболізму, активного синтезу попередників нуклеїнових кислот для активної проліферації і диференцировки і біосинтезу білків при активному рості плода і плаценти; забезпечення активних процесів метилювання достатньою кількістю кофакторів SAM; забезпечення живлення плоду на

ранніх етапах вагітності в умовах відсутнього кровопостачання до плаценти і захист від оксидативного стресу при переході від гістіотрофного до гематотрофного живлення плаценти і плоду. Усі ланки фолат-залежного одноуглецевого метаболізму в плаценті залучені до цих критичних процесів. На сьогодні нам відомі такі специфічні ознаки фолат-залежного метаболізму в плаценті:

*Фолатний цикл.* 5-Метилтетрагідрофолат є основною формою фолатів, циркулюючих у плазмі, і може транспортуватися в клітину за допомогою білків-переносників або рецепторів. Три незалежні типи систем відповідають за транспорт через мембрану фолатів. Це мембранний фолатний рецептор (FR), відновлений фолат-носій 1 (RFC1) і протонований, гем-асоційований білок-транспортер фолату (PCFT / HCP1). FR має високу спорідненість до фолатів і проводить опосередкований рецепторами ендоцитоз (однонаправлено) через клітинні мембрани. FR  $\alpha$  (FOLR1) експресується в плаценті, нирках та певних епітеліальних клітинах. FR  $\beta$  (FOLR2) експресується в плаценті, головному мозку, нирках, селезінці та тимусі (115).

У плаценті людини виявлено активність дигідрофолатредуктази, фолілполіглутаматкарбоксіпептидази II (фолатна кон'югаза), метіонін синтази, метилтетрагідрофолатредуктази та серин-гідроксиметилтрансферази. Виявлено експресію мРНК мітохондріальної C1-тетрагідрофолатсинтази (трифункціональний ензим: 5,10-метилтетрагідрофолатдегідрогеназа; 5,10-метенілтетрагідрофолат циклогідролаза; та 10-формілтетрагідрофолат синтетази), хоча активність її не вимірювали (91). У плаценті не експресується ген, який кодує 10-формілтетрагідрофолат дегідрогеназу, що відповідає за відновлення 10-формілтетрагідрофолату до тетрагідрофолату й окису вуглецю і негативно регулює проліферацію (12).

Активність серин-гідроксиметилтрансферази в плаценті мало змінюється протягом терміну вагітності і є порівняно низькою до активності

ферменту в плацентах інших ссавців. Це дає можливість припустити, що конверсія серину в плаценті не є головним джерелом гліцину для плоду (116).

*Метіоніновий цикл і процеси метилювання в плаценті.* Серед трьох відомих ізоформ першого ензиму циклу, метіонін-аденозил трансферази, в плаценті експресується друга ізоформа, що не активується додатково при підвищених концентраціях метіоніну. Метіонін-аденозил трансфераза конвертує метіонін в універсальний донор метильних груп, S-аденозилметіонін, який витрачається на численні реакції метилювання і на синтез поліамінів (за деякими даними близько 15 %). На шляху синтезу поліамінів SAM піддається декарбоксілюванню за участі ключового ензиму синтезу поліамінів, S-аденозилметіонін декарбоксилази (SAMdc, EC: 4.1.1.50), яка каталізує утворення S-аденозил-1-(метилтіо)-3-пропіламіну, що є донором амінопропільної групи для синтезу спермідину з путресцину і сперміну зі спермідину. Функції цих сполук вкрай важливі на ранніх етапах ембріогенезу, плацентації, ангиогенезу і розвитку плоду. Гени, причетні до синтезу поліамінів, активно експресуються в матці на ранньому етапі ембріогенезу; в плаценті їх експресія підвищується від 20-го до 40-го дня гестації і спадає до 90-го дня (231).

На шляху метилювання субстрат-специфічні метилтрансферази каталізують перенос метильних груп від SAM на відповідний субстрат, Плацента суттєво відрізняється від печінки за мішенями для метилювання. У плаценті не експресуються гени, які кодують гліцин N-метилтрансферазу та бетаїн-гомоцистеїн метилтрансферазу, які в печінці працюють “запобіжником”, здатним швидко переробляти надмірні кількості метіоніну і гомоцистеїну (12, 27). За відсутності такого механізму плацента є досить вразливою до підвищеного навантаження метіоніном і багатою на білки дієтою. У плаценті спостерігається висока активність метилювання ДНК порівняно з іншими мішенями метилювання, однак метилювання ДНК не є основною «статтею витрат» донорів метильних груп, таких як SAM, і не може

служувати шляхом утилізації надлишку метіоніну.

У заплідненій яйцеклітині швидко деметилується батьківська половина ДНК. Ініціація нового метилювання відбувається після п'ятого клітинного циклу і збігається з часом першої події диференціації – виокремлення трофктодерму, який утворює більшу частину структури плаценти, і внутрішньої клітинної маси, яка дає початок всім тканинам плода. Внутрішня клітинна маса стає гіперметильованою, а трофктодерм гіпометильованим. У новонароджених, які швидко нарощують масу, метилтрансфераза ГАМТ (К.Ф. 2.1.1.2), яка каталізує синтез креатиніну, може відповідати приблизно за 75% всього потоку метилювання. З цієї ж причини дуже важливою для молодого організму є експресія фосфатидилетаноламін метилтрансферази (РЕМТ К.Ф. 2.1.1.17), що забезпечує критичний для росту і розвитку фосфатидилхолін і використовує на утворення однієї молекули останнього три метильних групи. Фосфатидилетаноламін метилтрансфераза каталізує утворення до третини всього ендогенного фосфатидилхоліну (20). Епігенетична нерівність з більш високим загальним рівнем метилювання ДНК в ембріоні порівняно з плацентою зберігається впродовж всього періоду вагітності (99,117,118).

*Транссульфування.* Раніше було показано активність шляху транссульфування гомоцистеїну в цистеїн в плаценті людини (4). Баланс між шляхами утилізації гомоцистеїну в плаценті змінюється протягом вагітності. При нормальній вагітності у першому триместрі переважає транссульфування, а в зрілій плаценті більш активні процеси реметилювання (8,119).

У вагітних концентрація гомоцистеїну в плазмі крові суттєво нижча ніж у невагітних, вміст цистеїну, продукту перетворення гомоцистеїну через шлях транссульфування, також достовірно менший (119). Втім, цистеїн може далі метаболізуватися, в тому числі до глутатіону і таурину.

*Синтез таурину і глутатіону.* Серед усіх амінотіолів у плаценті людини цистеїн складає близько 63%, глутатіон – 19,7%, метіонін – 17% і гомоцистеїн



– 0,4% (71). Вміст цистеїну в плаценті перевищує вміст глутатіону, і їх співвідношення дорівнює 3/1. В печінці плода і новонародженого їх співвідношення складає відповідно 15/1 і 1,5/1. На відміну від цих показників в інших органах плода (13-й тиждень гестації) і в крові матері вміст глутатіону перевищує вміст цистеїну (4). Відомо, що гени шляху синтезу глутатіону експресуються в плаценті, а експресія швидкість-лімітуючого ензиму цистеїн-діоксигенази значно зростає у третьому триместрі.

Також в плаценті експресуються гени синтезу таурину, як через шлях перетворення цистеїнсульфінату у таурин, так і через каталіз коензиму А. Співвідношення активності цих шляхів і котрий з них переважає в плаценті остаточно невідомо (95,120).

Фолат-залежний метаболізм і супутні процеси — складна, багаторівнева система з багатьма компонентами і взаємозв'язками, регуляцією через транскрипцію, трансляцію і посттрансляційні модифікації. Досі достеменно незрозумілий механізм дії гомоцистеїну й увесь комплекс його ефектів на плаценту: оксидативний стрес, уповільнення проліферації трофобласту, зростання апоптозу і навіть відшарування синцитіотрофобласту від ворсинок (13). Традиційний редуцціоністський підхід, що передбачає вивчення окремих складових, не в змозі охопити всю картину і встановити механізми виникнення розладів, які спричинені цілим комплексом факторів. В сучасних біологічних дисциплінах намітився зсув методологічної парадигми до інтердисциплінарних досліджень на стику біології, фізики, інформатики з використанням холистичного підходу, що розглядає систему як єдине ціле. Такий підхід є системним і знаходиться в колі інтересів відносно нової галузі — системної біології. Системна біологія виходить з передумови, що система завжди являє собою більше ніж сума її компонентів і використовує інтеграцію високопродуктивних експериментальних методів («-омік») з комп'ютерним моделюванням для розуміння складних явищ і процесів (121).

Виникаючі властивості при об'єднанні елементів фолат-залежного

метаболізму в систему можуть стати ключем до розуміння складних захворювань, таких як прееклампсія, де відіграють роль як спадковість, так і фактори довкілля. Для опису поведінки фолат-залежного метаболізму в плаценті ми звернулися до математичного моделювання, використовуючи надбання в цій галузі.

## 1.6 Моделювання метаболізму *in silico*

Математичне моделювання стало ключовим методом для глибшого розуміння складних біологічних явищ і процесів та для передбачення фенотипів, що будуть проявлятися за різних умов. Вдала модель дозволяє прогнозувати реакцію системи на різні збурення і виявляти «слабкі ланки», дисфункція яких найсильніше позначається на всій системі.

В контексті дослідження метаболічних шляхів ми сфокусувалися на моделях метаболізму. Останніх є кілька принципово відмінних видів, що використовують різний математичний формалізм і призначені для побудови моделей різного масштабу. Виділяють стехіометричні моделі, кінетичні (базуються на диференційних рівняннях зміни концентрацій метаболітів за одиницю часу), топологічні моделі та інші. Більш детальні характеристики основних типів моделей надані в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 - Типи моделей метаболізму і їх характеристика, адаптовано і доповнено з (122)

Підхід	Опис	Характеристики	Обмеження	Приклади
Мережева топологія	Математична схема, що розкриває організаційні принципи в біологічній мережі	Цей підхід був в змозі з'ясувати принципи організації в біологічних системах, з великою кількістю біологічних об'єктів	Топологічний аналіз не враховує час і фізіологічний контекст	Мережі білок-білкових взаємодій, мережі коекспресії генів, зв'язки в метаболічних процесах. (123).
Кінетичні моделі	Класичні моделі, засновані на диференціальних рівняннях для аналізу біологічних систем з відносно невеликою кількістю параметрів	Кількісне моделювання (наприклад, з урахуванням концентрацій метаболітів), моделювання будь-яких типів взаємозв'язків між елементами системи які можна описати математичними рівняннями. Моделювання як стаціонарного стану системи, так і в динаміці	Потребують емпіричного визначення всіх параметрів системи, для побудови яких зазвичай недостатньо наявних експериментальних даних; зі збільшенням розміру системи потреби в обчислювальних потужностях ростуть експоненційно.	Кінетична модель метаболізму <i>E.coli</i> (124) математична модель метаболізму глутатіону в печінці людини (125)

Булеві моделі	Біологічні мережі, компоненти яких можуть знаходитися в одному з двох станів (0,1) і динаміка яких описана логічними правилами	Така методологія добре підходить для моделювання великих мереж, для яких мало відомих параметрів.	Обчислювальна складність може підвищуватися в залежності від складності мережі	Мережі регуляції транскрипції, сигнальні мережі (126)
Стохастичні моделі	Моделі, що описують явища імовірно, через присутність значних флуктуацій в системі	Усувають детермінований вигляд системи і вважають шум основоположним направляючим фактором для формування фенотипу біологічної мережі	Комп'ютерне моделювання забирає багато часу, затрати якого збільшуються відповідно росту числа компонентів	Моделі гліколізу-глюконеогенезу (128), моделювання циркадних ритмів (127)
Стехіометричні моделі	Моделі зансовані на даних геноміки та відомих фізіологічних даних.	Можуть відтворювати взаємодії генотипу і навколишнього середовища чи інших відомих факторів при формуванні фенотипу.	Якість результатів залежить від реконструкції метаболізму, яка, у свою чергу, залежить від наявних даних геноміки/транскриптоміки/протеоміки і фізіологічної інформації.	Аналіз балансу метаболічних потоків (Flux Balance Analysis, FBA) (129)

Продовження таблиці 1.1

Гібридні моделі	Комбінація кількох типів моделей і поєднання різних рівнів інформації (наприклад, мережа генної регуляції та метаболізм).	Надають можливість інтегрувати в одну модель процеси різного рівня, створюючи більш репрезентативні описи метаболізму-регуляції-сигналіngu	Часто моделювання різних процесів використовує різний математичний формалізм, що ускладнює об'єднання, складність визначення "точок дотику" різних процесів	Модель метаболізму і регуляції <i>E.coli</i> та <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (130)
-----------------	---	--	---	---

Моделі відрізняються за своїми масштабами - від тих, які намагаються реконструювати увесь метаболізм людини до тих, які описують декілька окремих реакцій (18,131,132).

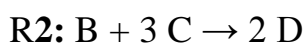
**1.6.1 Стехіометричні моделі.** Окремо ми зупинимось на стехіометричних моделях, які є найбільш вдалим компромісом між кількістю необхідних початкових даних для моделювання і прогностичним потенціалом моделі. Параметрами моделі є стехіометричні коефіцієнти метаболічних реакцій, що є добре відомими в наш час. Стехіометричні моделі окрім топологічних властивостей надають системну інформацію про клітинний метаболізм і розподіл потоків метаболітів через мережу реакцій за умов стаціонарного стану системи. Це дає змогу визначити питому вагу кожної реакції в метаболічному циклі (129). Стехіометричні моделі дозволяють також визначити всі можливості метаболічної мережі або, якщо в біологічних термінах, то можливі фенотипові прояви системи. Всі різновиди стехіометричного моделювання базуються на двох положеннях – на припущенні умовно стаціонарного стану системи і на законі збереження мас. Стехіометрична модель розглядає метаболічну систему в умовно стаціонарному стані, виходячи з того, що метаболічні реакції відбуваються з великою швидкістю, і система миттєво досягає рівноваги в процесі її взаємодії з зовнішньоклітинним простором. Недоліком стехіометричних моделей є те, що за їх допомогою неможливо аналізувати зміни системи в часі (132). Субстрати, що взаємодіють в реакціях між собою, створюють численні внутрішні компоненти системи – проміжні метаболіти або інтермедіати. Концентрація кожного інтермедіата в системі в стаціонарному стані залишається постійною за рахунок того, що сумарна швидкість приросту у всіх реакціях, у яких він створюється, дорівнює швидкості відтоку в усіх реакціях, в яких він споживається. На певному етапі в системі проходять незворотні реакції, внаслідок яких створюються «продукти» – метаболіти, що не вступають більше в реакцію з проміжними метаболітами. Ці продукти накопичуються з постійною швидкістю і створюють потік речовин, що виходить. Згідно із законом збереження мас – атомарний склад та кількість

атомів у потоці, що виходить, повинні дорівнювати атомарному складу та кількості атомів у потоці речовин, які входять. Рівняння потокової моделі є фактично записом закону збереження мас для пулу кожного з метаболітів даної метаболічної системи, включаючи субстрати і продукти, і наводиться у вигляді звичайних диференціальних рівнянь:

$$\frac{dc}{dt} = S \cdot v - \mu \cdot c \quad (1.1)$$

де:  $S$  – стехіометрична матриця розміром  $m \times n$ , де  $m$  – метаболіти, а  $n$  – реакції, а елементи матриці  $S_{ij}$  є стехіометричними коефіцієнтами метаболіта  $i$  в реакції  $j$ ;  $c$  (mol/L) =  $(c_1, c_2, \dots, c_m)$  - вектор концентрацій внутрішніх метаболітів;  $v$  (mol/L/hr) =  $(v_1, v_2, \dots, v_n)^T$  - вектор потоку, тобто швидкості перетворення метаболітів  $m$  в  $n$  реакціях;  $\mu$  (1/hr) – коефіцієнт, який враховує ступінь розведення в системі через зростання об'єму системи.

Наприклад, для простої системи з 4х реакцій, що перетворюють 5 метаболітів:



матриця  $S$  набуде вигляду:

<b>m</b>	<b>n</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>A</b>		-1	0	0	1
<b>B</b>		1	-1	0	0
<b>C</b>		0	-3	0	0
<b>D</b>		0	2	-1	0
<b>E</b>		0	0	1	-1

Оскільки в умовно стаціонарному стані системи не відбувається накопичення внутрішніх метаболітів, а зміна об'єму системи є незначною, то вище зазначене рівняння спрощується до вигляду:

$$S \cdot v = 0 \quad (1.2)$$

Згідно термодинамічних обмежень реакції відбуваються в певному напрямку. Деякі реакції є необоротними, що викликає необхідність ввести ще одне обмеження:

$$v \geq 0$$

Для клітинного метаболізму рівняння 1.2 є невизначеним, тобто таким, коли система може мати безліч рішень.

**1.6.1.1 Методи аналізу метаболічної мережі.** Згідно незмінного характеру стехіометричної матриці і залежно від відсутності/наявності експериментальних даних щодо метаболічних потоків (реакцій) запропоновано три технології для вирішення рівняння 1.1: аналіз метаболічних потоків (АМП; англ. metabolic flux analysis, MFA), аналіз балансу потоків (АБП; англ. flux balance analysis, FBA) і аналіз метаболічних шляхів (АМШ; англ. metabolic pathway analysis, MPA).

*Аналіз метаболічних потоків* базується на залученні експериментальних даних щодо деяких визначених потоків. Цей підхід дозволяє визначити вектор потоку тільки для певних умов функціонування системи. Зміна визначених потоків в інших умовах функціонування системи призведе до зміни метаболічного потоку.

*Аналіз балансу потоків* спрямований на отримання єдиного вирішення рівняння через введення цільової функції, наприклад, максимальне утворення продукту реакції, мінімальне використання енергетичних джерел тощо. Принциповим для цього підходу є те, яка цільова функція буде обрана. Метод балансу метаболічних потоків надає змогу передбачати фенотип системи



(розподіл метаболічних потоків) за певних обставин її функціонування, які задаються відповідними додатковими обмеженнями при створенні матриці. Наприклад, делецію певних генів можна дослідити через виключення метаболічного(их) потоку(ів), в якому (яких) бере участь відповідний протеїн. Дослідник може отримати уявлення, наскільки той чи інший ген є критичним для функціонування клітини/організму. За такою ж схемою можна передбачити функціонування системи за дії інгібіторів, зменшуючи верхню межу відповідних потоків до рівня, який відповідає рівню інгібування. Для аналізу балансу потоків використовують методи опуклого аналізу (convex analysis).

*Аналіз метаболічних шляхів* на відміну від перших двох технологій дозволяє визначити всі вектори метаболічних потоків, які існують в метаболічній мережі, і не потребує ані експериментальних даних, ані введення цільової функції. Вирішення рівняння 1.1 разом з нерівністю  $v \geq 0$  визначає простір у вигляді опуклого багатогранного конуса (convex polyhedral cone), в межах якого знаходяться всі можливі метаболічні шляхи, і їх кількість є безкінечною. Для отримання біологічно змістовних рішень вводяться ще два обмеження, а саме – нерозкладність потоків і їх системна незалежність. Для системного визначення можливостей метаболічної мережі сучасні дослідження зосереджені на двох підходах – аналізі елементарних мод (elementary mode analysis) і граничних шляхів (extreme pathways) (133).

**1.6.1.2 Елементарні моди.** На підставі визначення допустимого простору, в якому знаходяться всі можливі метаболічні шляхи, і додаткового обмеження у вигляді нерозкладності потоків отримуємо кінцевий набір рішень - елементарні моди. Під час вивчення властивостей метаболічної мережі, що є сукупністю векторів, було створено концепцію елементарних мод (134). Вектор потоку є елементарною модою (ЕМ) тоді і тільки тоді, коли: (i) він задовольняє вимогам стаціонарного стану; (ii) термодінамічно виправданий;

(iii) відсутній ще будь-який вектор потоку у системі, що досліджується, який би задовольняв цим вимогам і мав би таку ж саму функцію (135). Іншими словами, кожна мода є унікальною.

Таким чином, кожна метаболічна мережа характеризується: (i) унікальною інваріантною множиною ЕМ; (ii) кожна ЕМ є функціонально цілісною, тобто якщо буде вилучена хоч одна реакція, то елементарна мода не існуватиме; (iii) сукупність ЕМ відображає набір найпростіших шляхів мережі, що можуть використовуватися для детального опису кожного стаціонарного стану метаболічної мережі. В біологічному розумінні елементарні моди відображають всі можливості метаболічної системи, характеризують її сталість і вразливість.

**1.6.1.3 Граничні моди.** Від аналізу елементарних мод відрізняється аналіз граничних мод (extreme pathways). Для визначення граничних шляхів окрім вищеназваних обмежень застовується ще одне - системна незалежність шляхів. Це означає, що жодний граничний шлях не може бути представлений як не-негативна (non-negative) комбінація щонайменше двох інших елементарних мод. Множина «граничні шляхи» є підмножиною елементарних мод. Використання граничних шляхів стає актуальним для великих метаболічних систем, у яких кількість елементарних мод зростає дуже сильно і значно ускладнює аналіз системи.

**1.6.1.4 Використання стехіометричного моделювання.** В наш час розроблені стехіометричні моделі метаболізму кишкової палички (136), еритроцитів людини (137) тощо. Такі моделі знаходять застосування в медицині. На їх основі удосконалюються терапевтичні заходи (138), наприклад, оптимізовано систему екстракорпоральної штучної печінки (139). Потрібно знати лише стехіометричні рівняння реакцій досліджуваного метаболічного процесу.

Моделювання вже добре себе зарекомендувало в ряді застосувань:

оптимізація поживних середовищ для біотехнологічного виробництва пластиків, оптимізація середовища і видового складу продуцентів метану, для виробництва йогуртів і рекомбінантних білків, продукція куркуміну в *E.coli* тощо (140,141). Особливо слід відзначити успіхи в галузі системної медицини, оскільки вони співзвучні з далекоглядними цілями нашої роботи: ідентифікація біомаркерів для діагностики і підбір ліків (142).

Метаболічні моделі — необхідний крок по сходах до персоналізованої медицини, за допомогою моделювання можливо врахувати індивідуальні особливості організму, зумовлені мінливістю генотипу та факторів довкілля. Такий підхід дозволить призначати оптимальне лікування та профілактичні заходи для кожного пацієнта з мінімальними затратами, а також визначати найбільш значущі біомаркери для діагностики захворювань (рис. 1.3) (122,143). На сьогодні уже існують перші успішні приклади адаптацій моделей до індивідуальних даних геноміки і метаболоміки з успішною інтеграцією різних рівнів даних у кінетичну модель, але на разі обмежені відносно простими типами клітин (144).

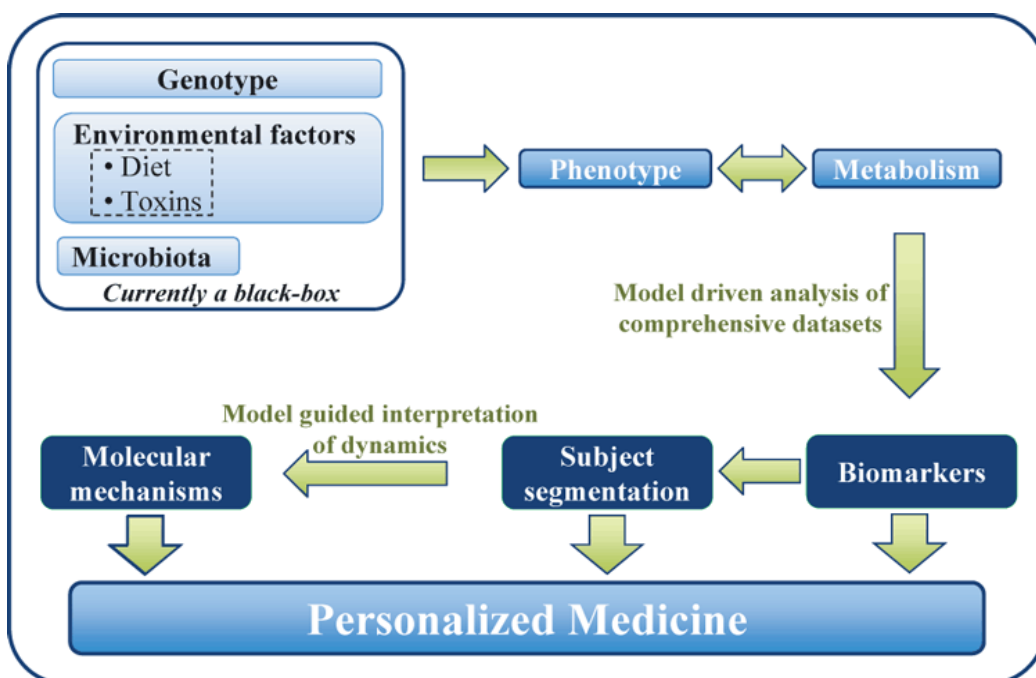


Рис.1.3 Системний підхід до персоналізованої медицини (143).

На підставі викладеного матеріалу зрозуміло, що фолат-залежний метаболізм є одним з базових метаболічних процесів впродовж розвитку плаценти і плоду і що будь-які зміни в окремих ланках системи будуть призводити до численних змін в інших ланках системи через тісний зв'язок між реакціями системи. Експериментально визначити наслідки будь-яких змін - це занадто складно і витратно.

*Тому мета даної роботи - розробити і охарактеризувати стехіометричну модель фолат-залежного одноуглецевого метаболізму в плаценті людини і застосувати модель для прогнозування впливу гіпергомоцистеїнемії і мутації в гені метилентетрагідрофолатредуктази на баланс метаболічних потоків в системі і експериментально перевірити передбачення, зроблені на основі моделі.*

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Методи дисертаційної роботи наведені у чотирьох блоках – методи біоінформатичної частини роботи, молекулярно-біологічні, аналітичні і методи статистичної обробки даних.

### **2.1 Біоінформатичні методи для реконструкції стехіометричної моделі фолат-залежних процесів**

Послідовність етапів моделювання:

- 1) створення стехіометричної матриці системи;
- 2) введення обмежень системи, а саме пошук значень потоків, для яких добуток матриці на потік (групу потоків) набуває нульового значення, що задовольняє вимогам стаціонарного стану;
- 3) введення структурних обмежень – пошук ключових метаболітів системи;
- 4) пошук повного набору елементарних мод, що присутні в досліджуваній системі з урахуванням вже віднайдених обмежень системи;
- 5) визначення питомої ваги кожної окремої біохімічної реакції системи в умовних одиницях;
- 6) проведення симуляції системи шляхом введення обмежень для визначення впливу підвищеного рівня гомоцистеїну і С677Т мутації в гені *MTHFR* на функціонування всіх ланок фолат-залежного метаболізму.

Модель побудована на основі даних про стехіометрію і напрям реакцій, які відбуваються в цитозолі. Для аналізу метаболічної мережі, а саме ключових метаболітів та елементарних мод, використали програмне забезпечення Metatool (<http://penguin.biologie.uni-jena.de/bioinformatik/networks/>) (145); для визначення величини метаболічних

потоків - програмне забезпечення YANA (<http://yana.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>), а для моделювання і аналізу балансу потоків за різних умов функціонування системи - програмне забезпечення COBRAToolbox (<https://opencobra.github.io/>) (146). Все програмне забезпечення знаходиться у відкритому доступі.. В якості цільової функції обирається реакція(ї), яка (які) віддзеркалюють функціональну спрямованість системи. Наприклад, для продуцентів біомаси - функція найшвидшого приросту, отже, синтез попередників нуклеїнових кислот. Для вузькоспеціалізованих органів, наприклад, для підшлункової залози об'єктивна функція - реакція синтезу інсуліну. Для поліфункціональної плаценти важко визначити єдину реакцію, яка би була цільовою функцією. Ми зупинилися на варіанті “максимально ефективна робота всіх ланок” і відповідна цільова функція – максимізація всіх потоків.

## **2.2 Молекулярно-біологічні методи**

**2.2.1 Об'єкт досліджень.** Об'єктом дослідження були зразки суцільної тканини плаценти і плацентарні експланти з першого і третього триместрів гестації. Зразки зрілих плацент були зібрані у районному пологовому будинку № 3 (Київ, Україна) та в Ірпінському пологовому будинку (Ірпінь, Україна). Зразки плацентарної тканини після абортивного переривання вагітності впродовж 5 - 7 тижнів гестації були отримані в Ірпінському пологовому будинку (Ірпінь, Україна) та у гінекологічному відділенні міської лікарні №2 м. Києва. Для дослідження було відібрано тільки зразки з неускладненою вагітністю. Кожен зразок супроводжувався особистою анкетною жінки, яка включала дані щодо способу життя, вживання алкоголю, куріння, дієти і професійних ризиків. Інформація про загальні клінічні показники матерів та про стан здоров'я новонародженої дитини були взяті з медичних карток.

Зразки тканини були зібрані відразу ж після абортів та пологів, промиті холодним стерильним 0,9% розчином NaCl, заморожені в рідкому азоті і зберігалися при  $-70^{\circ}\text{C}$  до подальших молекулярно-біологічних досліджень або використовувались *per se* для отримання плацентарних експлантів.

Зразки зрілої плаценти (близько 20 г) відбирали з центральної частини органу через всі шари. Для отримання експлантів матеріал транспортували на льоду до лабораторії, де і проводили подальші маніпуляції.

Письмову інформовану згоду було отримано від всіх жінок, зразки плацент яких було використано у дослідженні.

**2.2.2 Реактиви і обладнання.** У роботі були використані такі реактиви: поживне середовище DMEM/Ham's-F12, середовище MEM без гліцину і серину (№ M2279),  $^{13}\text{C}$ -2 гліцин, L-глутамін, бікарбонат натрію і 10% ембріональна сироватка великої рогатої худоби.. Стандартні зразки SAM і SAN, аденін, гуанін. Реагент Trizol (Неоген, Україна), 2,5 x реакційна суміш з SYBR® Green I для ПЛР в реальному часі (Синтол, Росія); набір для очищення ДНК Gene JET PCR Purification Kit, 4x Protein loading buffer і набір для зворотної транскрипції Revert Aid M-MuLV First Strand Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США); антитіла проти Cysteine Dioxygenase Type 1 (ab150705) (Abcam, UK); goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030 і anti-GAPDH (FL-33.5) (Santa Cruz Biotechnology, USA). Хемілюмінесцентний реактив Clarity Western System (BIO-RAD Laboratories, USA). Інші реактиви, крім означених, були від виробника Sigma, Німеччина.

*Основне обладнання.* Ампліфікатор для ПЛР MasterCycler Personal (Eppendorf, Німеччина), ампліфікатор для ПЛР у реальному часі BioRad CFX-96 (BioRad, США),  $\text{CO}_2$ -інкубатор (Assab, Швеція), Chemi-Doc (BIO-RAD, Laboratories, Inc., Hercules, California, USA), рідинний хромато-мас-спектрометр Agilent 1200 SL/DAD/FD/MSD 6130 з автоматичним дозатором

(Agilent Technologies, США).

**2.2.3 Культивування експлантів і клітин MCF-7.** Культури тканин широко використовуються в якості моделей для дослідження. Експлант – це шматочок живої тканини, взятий з організму та поміщений в штучне поживне середовище. В ньому зберігаються анатомічний зв'язок між клітинами та міжклітинний матрикс, а також відповідні умови підтримання життєздатності (147) (рис 2.1).

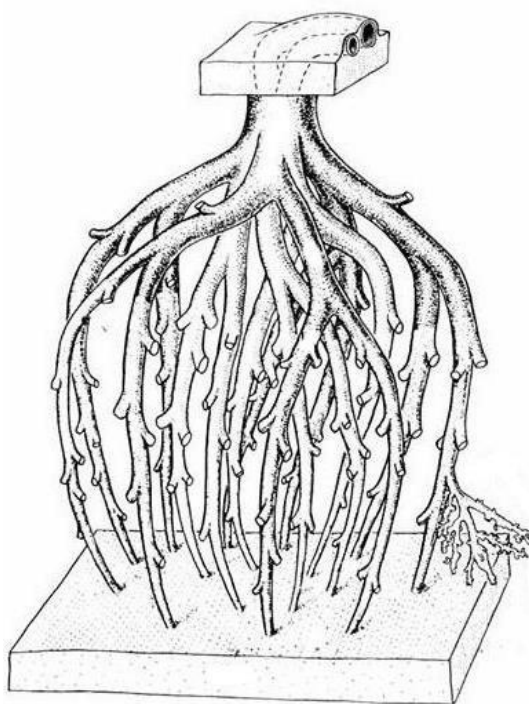


Рис.2.1 Схематичне зображення експланта плаценти (за Miller et al, 2005)(148).

На відміну від культури клітин, культивування експлантів забезпечує одночасний вплив створених умов інкубації на клітини різних типів у складі цілісного фрагмента тканини. Збереження взаємозв'язків і взаємовпливу між клітинами в експлантах максимально наближають цю модель до умов *in vivo* (108,148).

В експлантах, як і у тканині плаценти, присутні клітини різного походження – від клітин епітелію до мезенхімальних (фібробласти,



міофібробласти, міобласти гладеньких м'язів) та ендотеліальні клітини, клітини крові та імунної системи (клітини Хофбауера), клітини екзодермального походження (синцитіотрофобласт, цитотрофобласт) (149).

Експланти готували і культивували як описано у статті Waszyk та ін. (150) з модифікаціями, описаними нижче. Зразки плаценти, приблизно 5 г, промивали від крові в охолоджену стерильну фізіологічну розчину (0,9% NaCl), забуферену фосфатами (PBS, pH 7,2). Від тканини хірургічними ножицями відділяли шматочки 1-3 мм з ворсинками хоріону і переносили у культуральні плашки з різним середовищем залежно від типу експерименту, але в кожне із середовищ додавали стрептоміцин і біцилін (по 0,1 мг/мл кожного), 0,292 г/л L-глутаміну та 2,2 г/л натрій бікарбонату. Експланти культивували в інкубаторі з 5 % CO<sub>2</sub> і 20 % O<sub>2</sub> при 37 °C.

Для визначення вмісту SAM і SAH експланти культивували в DMEM/Ham's-F12 без сироватки протягом 24 годин, а для визначення концентрації пуринових основ - в середовищі MEM без гліцину і серину (№ M2279), в яке додавали <sup>13</sup>C-2 гліцин до кінцевої концентрації 80 μM і збіднену на пурини ембріональну сироватку великої рогатої худоби до кінцевих 10% за об'ємом. Сироватку попередньо діалізували проти 100-кратного об'єму натрій-фосфатного буферу (PBS) при 4° C протягом 2-х днів з використанням діалізної мембрани з пороговим значенням молекулярної маси (MWCO) у 25 кДа та з щоденним обміном діалізного розчину (151). І дослідні, і контрольні групи експлантів культивували протягом 24 годин; до дослідних зразків через 4 години після початку культивування додавали гомоцистеїн до кінцевої концентрації 20 μM і 40 μM.

Для визначення концентрації пуринових основ у клітинах лінії MCF-7 культивування проводили в тих же умовах, як і культивування експлантів, але процедура тривала до 4-х днів до утворення моношару. В останні 24 години досліді додали гомоцистеїн до кінцевої концентрації 20 μM. Після наростання моношару адгезовані клітини MCF-7 знімали з чашки 0,25%

розчином трипсину / ЕДТА протягом 1 хвилини при 37 °С, рахували їх кількість за використання гемоцитометра і піддавали центрифугуванню при 1500 g протягом 5 хв за 4 °С. Клітинний осад зберігали при -20 ° С до подальшої обробки.

Після культивування експланти обережно промокали від середовища стерильним паперовим рушником, зважували, поміщали в 2 мл мікроцентрифужні пробірки (0,5 г експлантів на пробірку) і зберігали за температури -80 °С до подальшої обробки.

**2.2.4 Визначення експресії генів фолатного циклу.** Виділення тотальної РНК зі зразків плаценти проводили за фенол-хлороформним методом з використанням реагенту Тризол. Якість виділеної РНК визначали за спектрами поглинання і співвідношенням поглинання на довжинах хвиль 260/230 нм та 260/280 нм. кДНК отримували за допомогою набору реагентів для зворотної транскрипції Revert Aid M-MuLV First Strand Synthesis Kit (ThermoScientific, США). Ампліфікацію фрагментів інтересу проводили в реальному часі з набором реагентів для ПЛР, що містить SYBRGreen1. Якість ампліфікації визначали за кривою плавлення. В кожен експеримент включали негативні контролю та зразки стандартів з відомою концентрацією для побудови стандартних кривих (5 точок у двох повторях кожна). Стандарти з відомою концентрацією отримували з очищених специфічних ампліконів. Далі за допомогою стандартних кривих визначали кількість індивідуальної РНК в копіях/нг тотальної РНК.

Праймери для ампліфікації підбирали за допомогою безкоштовної онлайн-програми PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Inc., США) і перевіряли їх унікальність за допомогою онлайн-інструментів Blast (NCBI, США) і рестрикційного аналізу. Всі праймери підбирали з температурою плавлення 60°С. Для того, щоб уникнути ампліфікації фрагменту геномної ДНК, праймери підбиралися таким чином, щоб прямий або зворотний

праймери перекривали ділянку ДНК на межі двох екзонів. Дані про праймери та довжину продуктів ампліфікації подано у таблиці 2.1. В роботі порівнювали експресію ряду генів у плаценті першого і третього триместрів вагітності, а також експресію генів в експлантах плаценти культивованих з або без додавання гомоцистеїну.

Таблиця 2.1

Праймери, використані для ампліфікації ділянок досліджуваних генів

Символ гена/ RefSeq мРНК	Праймери	Позиція амплікона на мРНК, п.н.	Рестрикційний аналіз ампліконів	
			Ензим	фрагменти п.н.
<i>GARS-AIRS-GART</i> NM_175085.2	forward 5'-CAAGGCCAGTCTGAAATCCT-3' reverse 5'-AGCGGCTCATGCCTATAATC-3'	1843-1925	SmlI	24, 58
<i>GARS</i> NM_001136005.1	forward 5'-GCAAAGAGCAAAGAAGAG-3' reverse 5'-TGAAACACAGACACGACA-3'	616-745	Rsa I	32, 98
<i>ATIC</i> NM_004044	forward 5'-GGCATTCACTCATACGGCACAA-3' reverse 5'-ATCCAGGGGCTCCATTTA-3'	718-896	Pvu II	124, 55
<i>TYMS</i> NM_001071	forward 5'-CAACCCTGACGACAGAAGAA-3' reverse 5'-GCTCACTGTTACCACATAGA-3'	649-761	Bgl II	46, 104
<i>MTR</i> NM_000254.2	forward 5'-GCAACAAGCCTCAAACCTCAACCA-3' reverse 5'-TTCCTCCCTTGCTTCTTCGTCTT-3'	5456-5635	Hinf I	133, 12, 35
<i>CBS</i> NM_000071.2	forward 5'-CCCAATTCTCACATCCTAGAC -3' reverse 5'-GACACTTCTCCTTCAGCTTC -3'	888-1063	PstI	83, 92
<i>CDO</i> NM_001801.2	forward 5'-GGAGGAGATTGAACTGGAGTAGCG-3' reverse 5'-GCAGGTTCCGTATGGCTGATGTTCT-3'	384-763	Tfi I	147, 184, 49
<i>GCLC</i> NM_001498.3	forward 5'-AGTGGGGCGATGAGGTGGAATAC-3' reverse 5'-CACCAGGGCAGAAGATTCCGTC -3'	621-809	Hpa II	59, 130

Умови ампліфікації були наступні: початкова денатурація 5 хв при 95 °С, далі 40 циклів, що склалися з етапів денатурації — 10 секунд при 95 °С, відпалювання - 20 секунд при 60°C та елонгація 30 секунд при 72 °С. Флуоресценція по каналу FAM/SYBR знімалася на етапі елонгації.

Експресію гена CDO визначали на рівні білка за допомогою вестерн-блот аналізу. Зразки плаценти (~150 мг) гомогенізували в лізуючому RIPA буфері (0.05 M Tris, pH 7.4, 1% NP-40, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 mM EDTA); гомогенат центрифугували при 15000 g, 4 °С, 20 хв., і супернатант (~50 µg білка) змішували з 4 x завантажувальним буфером, інкубували 10 хв при 95 °С і наносили на 5-12 % PAGE денатуруючий гель і піддавали електрофорезу. Білки напівсухим методом переносили на PVDF мембрану, яку тричі відмивали у TBS буфері і інкубували з первинними антитілами проти Cysteine Dioxygenase Type 1 (ab150705) (Abcam, UK) протягом ночі. Потім мембрану відмивали у TTBS буфері (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) і інкубували з вторинними антитілами goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030 (Santa Cruz Biotechnology, USA) впродовж 60 хв. при 20 °С. Білки проявляли з хемілюмінесцентним реактивом Clarity Western System (BIO-RAD Laboratories, USA) за використання Chemi-Doc (BIO-RAD, Laboratories, Inc., Hercules, California, USA), а оптичну густину смуг визначали за допомогою програми GelPro 3.1. Для нормалізації інтенсивності смуг мембрану змивали і піддавали інкубації з антитілами проти білка домашнього господарства anti-GAPDH (FL-33.5) (Santa Cruz Biotechnology, USA) і в подальшому обробляли, як зазначено вище.

## **2.3 Аналітичні методи**

### **2.3.1 Застосування мас-спектрометрії в дослідженнях метаболізму.**

Мас-спектрометрія — метод визначення хімічного, фазового складу і молекулярної структури речовини, що базується на реєстрації спектра мас йонів, утворених внаслідок йонізації атомів і (або) молекул зразка. Маса йона

визначається за його відхиленням у магнітному полі (152).

Розвиток і зростання роздільної здатності мас-спектрометрії дозволили розділяти органічні сполуки з різним ізотопним складом елементів. Це відкрило можливості для дослідження перетворень речовин *in vivo*: за включенням важких стабільних ізотопів атомів з мічених субстратів до продуктів біосинтезу та проміжних метаболітів можна відстежити напрямки метаболічних потоків, а за швидкістю споживання мічених субстратів і утворення мічених вторинних метаболітів чи біополімерів можна встановити швидкості протікання біохімічних процесів. Особливо широке застосування знайшло відстеження субстратів, мічених стабільним важким ізотопом вуглецю  $^{13}\text{C}$  (153,154).

### **2.3.2 Виділення і кількісна оцінка SAM і SAN методом твердофазної екстракції і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії.**

Прокультивовані експланти (0,5-0,8 г) розтирали у керамічних ступках з рідким азотом. Додавали 2,5 мл 0,5 М  $\text{HClO}_4$ , додатково розтирали та переносили у мікроцентрифужні пробірки (1,5 мл) і струшували 10 хв на термошейкері при 600 обертів/хвилину за кімнатної температури. Проби центрифугували 15 хв при 11000 g, 4 °C, відбирали супернатант в охолоджену пробірку та доводили 10 % розчином аміаку до pH 6,8.

Кислоторозчинну фракцію тканини пропускали через колонки для твердофазної екстракції Agilent BondElut PBA. Кондиціонування проводили 0,1М розчином оцтової кислоти (5 порцій по 1 мл, pH 2,6) та 20 мМ розчином ацетату амонію (5 порцій по 1 мл 5, pH 6,8).

Елюювання проводили 0,1 М розчином оцтової кислоти (100 мкл x 10 порцій, pH 2,6). Елюат збирали в пробірки і зберігали в рідкому азоті через нестабільність SAM до проведення рідинної хроматографії і мас-спектрометрії. Колонки використовували одноразово. Стандарти SAM, SAN та їхню суміш розводили у розчині 0,1 М оцтової кислоти в день аналізу.

Рідинна хроматографія виконувалася на системі Agilent 1200 з одноквадрупольним мас-детектором Agilent 6130 із застосуванням колонок Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 мм x 4,6 мм, 5  $\mu$ m). Колонки елюювали потоком 0,5 мл/хв ізократичною мобільною фазою вода + 10% метанол, доведеною оцтовою кислотою до рН 5. Для зразків використовували напругу йонізації 70 вольт. Стандарти вводили в об'ємі 5, 50 та 100  $\mu$ л, зразки – 50  $\mu$ л. Час елюції складав 12 хв, час виходу SAM – 2,9 хв, SAH – 5,4 хв. Очікувана йонна маса (M/Z) для SAM становила 399, для SAH – 385. Отримані результати опрацьовувалися у програмному забезпеченні Agilent Chemstation (Agilent Technologies, США) та LibreOffice Calc (The Document Foundation, Німеччина).

Для валідації методу згідно рекомендацій Адміністрації з Контролю Харчових Продуктів і Лікарських Засобів США (FDA) визначали варіацію в одному пробігу, варіацію між пробігами, варіацію між різними днями, лінійність методу, ліміт детекції та ліміт кількісного визначення.

**2.3.3 Виділення і кількісний аналіз пуринових азотистих основ методом кислотного гідролізу і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії.** *Попередня обробка зразків* проводилася згідно раніше опублікованих методик (155) з модифікаціями. Осад клітин MCF-7 в діапазоні  $(3 - 7) \cdot 10^6$  та плацентарні експланти (приблизно 0,5 г) суспендували в 0,4 мл 0,4 М HClO<sub>4</sub> і обробляли ультразвуковим дезінтегратором MSE Soniprep 150 Plus (MSE, Великобританія) протягом 1 хв при 23 кГц і 150 Вт. Після цього зразки гідролізували на киплячій водянній бані протягом 60 хв для розриву глікозидних зв'язків між пуриновою основою і рибозою/дезоксирибозою та охолоджували на крижаній водянній бані протягом 5 хв. Після цього нейтралізували 5 М КОН. Нерозчинні частки видаляли центрифугуванням при 11 000 g, 4 °C протягом 10 хв. Супернатант збирали і зберігали за температури -20° C до аналізу. Для контролю за процесом передобробки до кожного зразка перед гідролізом додавали 200 нг кофеїну

(1,3,7-триметилпурин-2,6-діон) в якості внутрішнього стандарту.

*ВЕРХ/МС-аналіз для кількісного визначення новоутворених та загальних пуринів* проводили за допомогою високоефективної рідинної хроматографії - мас-спектрометрії з іонізацією електроспреем (ВЕРХ/ЕРІ/МС) з використанням одноквадрупольних мас-спектрометрів з діодно-матричними спектрофотометричними детекторами (DAD).

Гідролізати зразків, 50 мкл, вводили на хроматографічну колонку C18 Zorbax, яку елюювали мобільною фазою, яка складалася з 60% розчину А (0,1М NH<sub>4</sub>Ac з 10% метанолом, доведеним до рН 5,0 мурашиною кислотою) та 40% розчину В (деіонізована вода) протягом 10 хв при швидкості потоку 0,5 мл / хв і температурі термостата - 30 ° С і детекції в УФ при 254 - 260 нм.

Елюати з колонки вносили безпосередньо в мас-спектрометр, який працював в ЕРІ-режимі з енергією іонізації 70 В і з детекцією в режимі SIM (моніторинг вибраних іонів). Режим позитивного електроспреею застосовувався для виявлення протонізованих молекулярних іонів [М + Н] + аденіну, гуаніну та гіпоксантину, тоді як негативний режим - для виявлення депротонованого іона [М-Н] - кофеїну.

Аналіти були кількісно оцінені за допомогою калібрувальних кривих на основі середніх значень триразових вимірювань для п'яти різних концентрацій аденіну, гуаніну та гіпоксантину в межах  $1 \times 10^{-6}$  -  $3,0 \times 10^{-4}$  моль / л шляхом побудови графіків залежності площі мас-піків залежно від кількості кожного введеного стандарту. Лінійність методу досліджувалася шляхом обчислення регресійної лінії за допомогою методу найменших квадратів.

Нижня межа детекції (Limit of detection, LOD) була встановлена шляхом введення стандартних розчинів аналіту при поступовому зменшенні концентрації, поки співвідношення сигнал / шум (S / N) не впало нижче 3: 1 для окремого аналізованого стандарту. Межі кількісного визначення (Limit of Quantification, LOQ) обчислювались як 10-кратний сигнал виявлення.

Основні розчини стандартів (аденін-, гуанін-НCl, гіпоксантин та кофеїн)

готували шляхом розчинення кожної основи в концентрованій мурашиній кислоті (200 мкл / мг основи), розводили до концентрації 1 мг / мл буфером - 0,1M NH<sub>4</sub>Ac, 10% метанолу, доводили до рН 5,0 мурашиною кислотою. Кінцеву концентрацію 50 мкг / мл отримували розведенням буфером NH<sub>4</sub>Ac (0,1 M NH<sub>4</sub>Ac, 10% метанолу, рН 5,0). Вихідні розчини зберігали за температури + 4 °С (Примітка! Зберігання при температурі нижче + 4 °С може спричинити осадження аналітів).

*Валідація методу* проведена за стандартною схемою – визначення стабільності стандартних сполук (концентрація кожного аналіту 4 x 10<sup>-5</sup> моль/л) протягом одного місяця при зберіганні за температури + 4 °С; варіація визначення концентрацій протягом дня та між днями шляхом проведення трьох повторних пробігів зразків чистих стандартів та попередньо оброблених біологічних зразків; якість відмивання колонки водою між пробами (carryover), - згідно до рекомендацій FDA щодо валідації біоаналітичних методів.

*Аналіз даних мас-спектрометрії* проведений за допомогою програмного пакету LC/MSD ChemStation (Agilent Technologies, Санта Клара, Каліфорнія, США). Інтенсивність біосинтезу пуринів в зразках віднесена до маси експлантів і до кількості клітин MCF-7.

## **2.4 Статистичні методи обробки даних**

Всі дані перевіряли на нормальність розподілу за тестом Шапіро-Вілкі. В разі нормального розподілу даних ( $p > 0.05$ ) ми застосовували параметричні методи статистичної обробки, а при  $p < 0.05$  – непараметричні. В роботі використані  $W$  критерій Вілкоксона,  $T$ -тест Стюдента і one-way ANOVA і *post hoc* Newman-Keuls тест для визначення статистичної надійності різниці, яка вважалася статистично значущою при  $p < 0.05$ . Статистичну обробку проведено в програмі STATISTICA 10 Enterprise 10.0.1011.6, StatSoft, Inc.



## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1 Експресія генів фолат-залежного метаболізму в плаценті за даними Human Protein Atlas

Фолат-залежний метаболізм в найбільшій мірі вивчений в печінці лабораторних тварин (119,156,157). В інших органах еукаріотів він вивчений значно менше. Але достеменно відомо, що експресія деяких генів фолат-залежного метаболізму має тканино-специфічний характер. Перед тим, як розпочати створення моделі фолат-залежного метаболізму в плаценті людини, ми проаналізували експресію його генів за даними Human Protein Atlas [<https://www.proteinatlas.org/>] (158) і даними літератури (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Експресія генів фолат-залежного метаболізму в плаценті людини за даними літератури і Human Protein Atlas

Ген	Назва білка	Рівень протеїну
Метіоніновий цикл		
MAT1A	Метіонаденозилтрансфераза, субодиниця 1A	не детектується
MAT2A	Метіонаденозилтрансфераза, субодиниця 2A	середній
MAT2B	Метіонаденозилтрансфераза, субодиниця 2B	середній
DNMT1	ДНК-н-метилтрансфераза 1	високий
GNMT	Гліцин-н-метилтрансфераза	не детектується
ANCY (SAHN)	S-аденозилгомоцистеїн гідролаза	середній
MTR (MS)	метіонінсинтаза	низький
MTRR	Метіонінредуктаза редуктаза	середній
ВHMT	бетаїнгідроксиметилтрансфераза	не детектується
Фолатний цикл		
<i>MTHFR</i>	метилентетрагідрофолатредуктаза	високий
<i>MTHFD1</i>	метилентетрагідрофолат дегідрогеназа, метилентетрагідрофолат циклогідролаза, формілтетрагідрофолат синтетаза	середній
<i>DHFR</i>	дигідрофолатредуктаза	високий

## Продовження таблиці 3.1

<i>SHMT2</i>	серингідроксиметил трансфераза	середній
Синтез пуринів і піримідинів		
<i>GART (GARS-AIRS-GART)</i>	гліцинамід рибонуклеотидсинтетаза - аміноімідазол рибонуклеотид синтетаза - гліцинамід рибонуклеотид трансформілаза	середній
<i>AICART</i>	фосфорибозиламіноімідазол-карбоксамід формілтрансфераза	високий
<i>TS</i>	тимідилатсинтаза	середній
Транссульфування		
<i>CBS</i>	цистатіонін- $\beta$ -синтаза	Низький (4)
<i>CTGL (CTH)</i>	цистатіонін- $\gamma$ -ліаза	Низький (232)
Синтез таурину		
<i>CDO</i>	цистеїндіоксигеназа	не детектується
<i>CSAD</i>	цистеїнсульфінат діоксигеназа	середній
<i>HtDH</i>	дегідрогенізація гіпотаурину	Спонтанна реакція
Синтез глутатіону		
<i>GCLc</i>	глутамат-цистеїн лігаза, каталізуюча і модифікуюча субодиниці відповідно	середній
<i>GCLm</i>		середній
<i>GSS</i>	глутатіонсинтаза	не детектується

Дані з таблиці 3.1 щодо деяких генів, експресія яких «не детектується», ми перевірили власноруч, використовуючи класичні методи молекулярної біології. Ми, паралельно з групою Patel і колеґ, показали, що в плаценті людини експресується ген *CBS*, який кодує цистатіонін- $\beta$ -синтазу (EC 4.2.1.22) (13,100). Ензим каталізує початкову реакцію процесу транссульфування, яка зв'язує метіоніновий цикл з синтезом таурину і глутатіону (11). В роботах нашої групи було вперше виявлено каталітичну активність *CBS* в плаценті людини (71). В дисертаційній роботі була вперше перевірена експресія декількох генів фолат-залежного метболізму в першому і третьому триместрах вагітності.

### Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

Родрігес Р., Лущик І., Оболенська М. Стехіометрична модель фолатзалежного метаболізму одноуглецевих груп у плаценті людини. Укр. біохім. журн. 2012; 84 (4): 20-31.

### 3.2 Експресія генів, які кодують ензими синтезу пуринів, тимідилату, метіонінсинтази і цистатіонін-β-синтази в першому і третьому триместрах вагітності

Плацента – динамічний орган, що зазнає великих змін протягом 9 місяців свого існування. Для кращого розуміння її функціонування і отримання даних для подальшого уточнення математичних моделей ми порівняли експресію ключових генів одноуглецевого метаболізму на першому і останньому триместрах вагітності.

Таблиця 3.2

Концентрація мРНК в зразках плаценти з I і III триместрів гестації

мРНК	Копії/нг тотальної РНК медіана (Q <sub>ниж.</sub> ; Q <sub>верх.</sub> )		Порівняння показників в I і III триместрах	
	I триместр	III триместр	Значення р	Співвідношення, I/III триместр
<i>GARS-AIRS-GART</i>	20,2 (11,07; 31,65)	17,5 (11,3; 23,35)	0,340	1,2
<i>GARS</i>	91,3 (67,55; 116,5)	33,7 (25,67; 40,4)	0,006	2,7
<i>ATIC</i>	346,5 (286,25; 395,5)	136,0 (81,72; 171,5)	0,004	2,5
<i>TYMS</i>	24,8 (17,5; 46,25)	27,05 (15,32; 44,9)	0,242	0,9
<i>MS</i>	81,1 (54,15; 105,4)	30,9 (22,5; 44,9)	0,017	2,6
<i>CBS</i>	14,1 (11,47; 20,55))	5,2 (3,06; 7,45)	0,003	2,7

*GART* і *ATIC* мРНК кодують, відповідно, білок *GART* (EC 2.1.2.211) з трьома ензиматичними активностями і білок *ATIC* (EC 2.1.2.3, 3.5.4.10) з

двома ензиматичними активностями. Ці ензими надають, відповідно, другий та восьмий атоми вуглецю в пуринове кільце від формільної групи 10-формілтетрагідрофолату (49). Транскрипт *MS* кодує ензим метіонінсинтазу (EC 2.1.1.13), який поєднує фолатний і метіоніновий цикли, а транскрипт *CBS* кодує цистатіонін- $\beta$ -синтазу (EC 4.2.1.22), яка каталізує початкову реакцію процесу транссульфування, що зв'язує метіоніновий цикл з синтезом таурину і глутатіону (11).

Кількість транскриптів *GARS-AIRS-GART* істотно не змінюється від першого триместру до кінця вагітності (Табл. 3.2). Слід зазначити, що ген людини *GARS-AIRS-GART* може кодувати не тільки трифункціональний білок вагою 110 кДа, але і монофункціональний білок *GARS* вагою 50 кДа. Цей вкорочений з С-кінця ензим *GARS* утворюється шляхом альтернативного поліаденілювання в інtronі між останнім екзоном *GARS* і першим екзоном *AIRS* (159). Ми розробили праймери спеціально для послідовності *GARS* і показали, що кількість транскриптів *GARS* більш ніж в чотири рази перевищує кількість повнорозмірних транскриптів *GARS-AIRS-GART* у зразках з першого триместру і лише приблизно у два рази у зразках з третього триместру (Табл. 3.2). Концентрації транскриптів *ATIC*, *MS* і *CBS* є нижчими в третьому триместрі порівняно з першим і лише концентрація транскриптів *TYMS* майже не змінюється при переході від першого до третього триместру.

**Результати даного розділу опубліковані в роботі:**

Родрігес Р., Корнєєва Л., Ральченко С., Вакуленко О., Манжула Л., Мельник В., Верещак О., Оболенська М. Експресія генів, які кодують ензими ключових реакцій фолат-залежного метаболізму, у плаценті людини в першому і третьому триместрах неускладненої вагітності. Перинатологія і Педіатрія. 2014; (4): 24-30.

### 3.3 Експресія генів метаболізму цистеїну в першому і третьому триместрах вагітності

Гомоцистеїн, який утворюється в метіоніновому циклі, знешкоджується двома шляхами – реметилюється до метіоніну у метіоніновому циклі або піддається транссульфуванню з утворенням цистеїну. Два шляхи катаболізму споживають основну масу цистеїну: окиснення з подальшим синтезом таурину і синтез глутатіону з цистеїну (Рис. 1.1). В контексті даної роботи нас цікавило, як співвідносяться ці шляхи в плаценті і наскільки модель точно відтворює ситуацію *in vivo*. Ми зосередилися на експресії двох генів на розгалуженні метаболічних шляхів, де цистеїн залучається або до синтезу глутатіону — ензим глутамат-цистеїн лігаза, або йде на синтез таурину, починаючи з реакції, каталізованої цистеїндіоксигеназою. Ензими глутамат-цистеїн лігаза і цистеїндіоксигеназа кодуються відповідними генами *GCLC* та *CDO*. Рівень мРНК, залучених до обміну цистеїну, показує відмінності в експресії між першим та третім триместрами. В першому триместрі кількість мРНК *GCLC* переважає над *CDO*, але в третьому триместрі ситуація кардинально змінюється (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Концентрація мРНК в зразках плаценти з I і III триместрів гестації

мРНК	Копій/нг тотальної РНК медіана (Q <sub>ниж.</sub> ; Q <sub>верх</sub> )		Порівняння показників в I і III триместрах	
	I триместр	III триместр	Значення p	Співвідношення I/III триместр
<i>CDO</i>	15,5 (9,3; 31,2)	238,1 (232,4; 296,8)	0,004	0,065
<i>GLCC</i>	45,2 (41,0; 51,9)	22,1 (7,2; 44,9)	0,2	2,045

Несинхронні зміни у концентрації двох мРНК між першим і третім триместром вказують на диференційну регуляцію експресії обох генів.

Зміни в експресії гена CDO були підтверджені на рівні білка (Рис. 3.1)

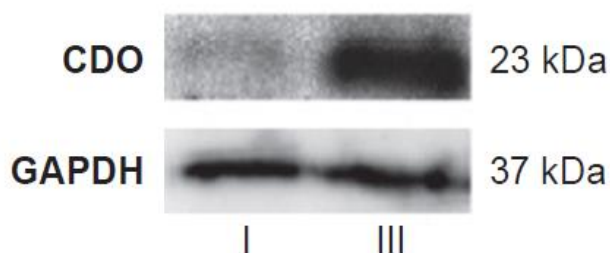


Рис.3.1 Вміст білків CDO і GAPDH в зразках плаценти з першого і третього триместрів гестації

**Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:**

K. L. Korneeva, R. R. Rodriguez, S. V. Ralchenko, O. V. Martunovska, A. O. Frolova, O. P. Martsenyuk, L. V. Manzhula, V. T. Melnyk, O. Y. Shkoropad, M. Yu. Obolenska. Expression of genes, encoding the enzymes of cysteine metabolism in human placenta in the first and third trimesters of uncomplicated pregnancy. *Ukr.Biochem.J.* 2016; 88(1): 88-98.

### **3.4 Стехіометрична модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини**

Стехіометричне моделювання складається з декількох послідовних етапів – обрання реакцій з даними про їх стехіометрію, визначення обернених і не обернених реакцій і їх компартменталізації; створення матриці мережі, завдяки якій біологічна інформація про стехіометрію реакцій формалізується і записується математичними символами; і створення математичної моделі, яка являє собою систему лінійних рівнянь для кожного із компонентів метаболічної системи в умовно стаціонарному стані і за балансу мас внутрішніх метаболітів. Модель фолат-залежного метаболізму для плаценти була реконструйована на основі реакцій, представлених в таблиці 3.4.

### 3.4.1 Реакції фолат-залежних процесів, обрані для моделювання

Таблиця 3.4

#### Стехіометрія реакцій, використаних для моделювання

№ п/п	Реакції за назвою ензиму	Стехіометрія реакцій
Реакції метіонінового циклу		
1	MAT	$ATP + H_2O + Met = dph + ph + SAM$
2	Methylases	$S + SAM = SAH + Smet$
3	SAHH	$H_2O + SAH \leftrightarrow Ado + Hcy$
4	MS	$Hcy + CH_3THF = Met + THF$
Реакції тетрагідрофолатного циклу		
5	MTHFR	$CH_2THF + H + NADPH = NADP + CH_3THF$
6	MTD	$CH_2THF + NADP \leftrightarrow CHTHF + H + NADPH$
7	MTCH	$CHTHF + H_2O \leftrightarrow CHOTHF$
8	FTS	$ATP + Frmt + THF \leftrightarrow ADP + ph + CHOTHF$
9	DHFR	$DHF + H + NADPH = NADP + THF$
10	SHMT	$Ser + THF \leftrightarrow CH_2THF + Gly + H_2O$
Реакції синтезу пуринів та піримідинів		
11	PGT	$GAR + CHOTHF = AICAR + THF$
12	AICART	$AICAR + CHOTHF = FICAR + THF$
13	TS	$CH_2THF + dUMP = DHF + dTMP$
Реакції транссульфування.		
14	CBS	$Hcy + Ser = Cst + H_2O$
15	CTGL	$Cst + H_2O = Cys + NH_3 + oxbt$
Реакції синтезу таурину		
16	CDO	$Cys + O_2 = SulfAla$
17	SADC	$SulfAla = CO_2 + hypotaur$
18	htDH	$H_2O + hypotaur + NAD = H + NADH + taur$
Реакції синтезу глутатіону		
19	GCL	$ATP + Cys + Glut = ADP + GlutCys + ph$
20	GSS	$ATP + GlutCys + Gly = ADP + GSH + ph$
Реакції введення/виведення метаболітів		
21	Taur_transp	$Taur = Taur_{out}$
22	Met_transp	$Met_{out} = Met$
23	Cys_transp	$Cys_{out} = Cys$
24	Glut_transp	$Glut_{out} = Glut$
25	Ser_transp	$Ser_{out} = Ser$
26	Gly_transp	$Gly_{out} = Gly$
27	GSH_transp	$GSH = GSH_{out}$

**Примітка.** Метаболіти з позначкою «out» означають позасистемні метаболіти,

Реакції фолат-залежного метаболізму відбуваються в трьох компартментах клітини - в цитоплазмі, мітохондріях і в ядрі. Три

взаємозалежні шляхи - синтез пуринів *de novo*, синтез тимідилату і реметилування гомоцистеїну до метіоніну і утворення SAM, відбуваються в цитоплазмі. В ядрі фолатні кофактори необхідні для синтезу тимідилату і можуть приймати участь у деметилуванні гістонів (деметилаза KDM1). В мітохондріях утворюється форміат внаслідок катаболізму амінокислот серину, гліцину, саркозину і диметигліцину. Форміат є джерелом одноуглецевих фрагментів для фолат-залежного метаболізму в цитоплазмі і ядрі. Для процесів у цитоплазмі одноуглецеві фрагменти можуть надходити від катаболізму гістидину, пуринів і серину (14). У цитоплазмі відбуваються пов'язані з метіоніновим циклом процеси транссульфування і синтез глутатіону.

При побудові моделі ми обмежилися фолат-залежними процесами, які відбуваються в цитоплазмі, і реакціями транссульфування і синтезу глутатіону. Модель включає сумарний потік через метилтрансферазні реакції, в яких SAM виступає як кофактор і донор метильних груп. Модель не включає реакції синтезу поліамінів, які виводять SAM з метіонінового циклу (близько 15 %), і реакції реутилізації метіоніну (*methionine salvage pathway*) (197).

При моделюванні транспортних реакцій ми розглядали імпорт амінокислот (таурину, метіоніну, цистеїну, глутамату, серину, гліцину, глутатіону), не деталізуючи їх походження. Насправді амінокислоти приходять в плаценту з кров'ю матері, приймають участь в плацентарному метаболізмі, потрапляють до плоду і від плода повертаються до плаценти. Якщо ж змоделювати транспорт інших метаболітів (фолати, гомоцистеїн), то їх перетворення всередині циклів фолат-залежного метаболізму практично припиняється і будь-які зміни в системі компенсуються зниженням/активацією потоків транспорту.

Серед усіх метаболітів виокремлено *внутрішні і зовнішні метаболіти*. До внутрішніх метаболітів належать: DHF, GSH, SulfAla, SAM, THF, AICAR, SAH, Taur, Huptaur, CHTHF, Met, Glut, Cys, Hcy, GlutCys, CH<sub>2</sub>THF, Gly, CH<sub>3</sub>THF, H<sub>2</sub>O, Cst, Ser, CHOTHF (всього 22 сполуки). Зовнішні метаболіти



включають: HCO<sub>2</sub> (надалі в тексті буде використовуватися аббревіатура Frmt – форміат), NADPH, dTMP, Met\_out, CO<sub>2</sub>, Gly\_out, Ado, S (так позначено субстрат у реакції метилювання), dph, oxobutanoate, Cys\_out, FICAR, GAR, Taur\_out, NADH, Glut\_out, ATP, NH<sub>3</sub>, NADP, dUMP, ADP, NAD, Smet (метилований субстрат), Ser\_out, ph (всього 25 речовин). Метаболіти класифікуються як внутрішні або зовнішні згідно їх (не)відповідності умовам стаціонарного стану. Іншими словами, обсяг утворених внутрішніх метаболітів дорівнює обсягу спожитих внутрішніх метаболітів, Згідно визначення Шустера та ін., зовнішні метаболіти (які не є обов'язково позаклітинними) на відміну від внутрішніх метаболітів не виконують цієї умови, оскільки виходять за межі системи, яка вивчається. (160).

Серед метаболічних реакцій виокремлюються 10 оборотних реакцій (Glut\_transp, SAHH, Cys\_transp, MTD, MTCH, FTS, SHMT, Gly\_transp, Ser\_transp, Met\_transp) і 15 необоротних реакцій (TS, MTHFR, CTGL, MAT, PGT, Taur\_transp, SADC, AICART, Methylases, GCL, MS, GSS, DHFR, CD, CBS). Необоротність реакцій означає, що за фізіологічних умов фактичний потік має завжди один і той же знак, тобто відбувається тільки в одному напрямку. Ці дані було використано для реконструкції стехіометричної моделі і аналізу її властивостей за різних умов.

**3.4.2 Створення стехіометричної матриці системи фолат-залежного метаболізму.** За біохімічними реакціями, наведеними в переліку, і за їх класифікацією за критерієм оберненості/необерненості та за розподілом метаболітів на внутрішні і зовнішні створено стехіометричну матрицю, де стовпчики (n) означають реакції (потоки) системи, а рядки – метаболіти, які приймають участь в реакціях (Додаток А). Числові значення наводяться в матриці у трьох формах – “-1” (або більше число, залежно від стехіометричного коефіцієнту — метаболіт витрачається в реакції), “0” (метаболіт не бере участі в реакції), “1” (або більше число, залежно від

стехіометрії — метаболіт утворюється в реакції).

**3.4.3 Визначення обмежень мережі, які задовольняють умовно стаціонарному стану системи.** Для створення метаболічної мережі вводяться обмеження, які дають змогу знайти рішення для рівняння 1.1 і таким чином відобразити метаболічні шляхи в умовно стаціонарному стані. Для загальної характеристики системи є три типи необхідних обмежень, а саме: принципи умовної стаціонарності системи, збереження мас і  $v \geq 0$ . Ці обмеження забезпечують функціонування системи в умовно стаціонарному стані, дозволяють визначити структуру моделі з її вузловими елементами і елементарні моди мережі тобто набір найкоротших і найпростіших шляхів мережі з наступною оцінкою їх питомої ваги в системі.

Для отримання обмежень, які б задовольняли вимогам умовно стаціонарного стану, програма Metatool визначає таку комбінацію реакцій (що представлені стовпчиками в стехіометричній матриці), які, перемножені на матрицю  $S$ , давали б нульове значення і таким чином задовольняли б головну умову стехіометричного моделювання  $S \cdot v = 0$ . У процесі цієї операції отримали перелік із 6 груп, у кожену із яких входять реакції, об'єднані за даним критерієм. Якщо підсумувати ліві і праві половини рівнянь наведених реакцій, то отримуємо рівняння бруто-процесу перетворення метаболітів у кожній групі (табл. 3.5).

*Таблиця 3.5*

Вектори, які обмежують простір мережі

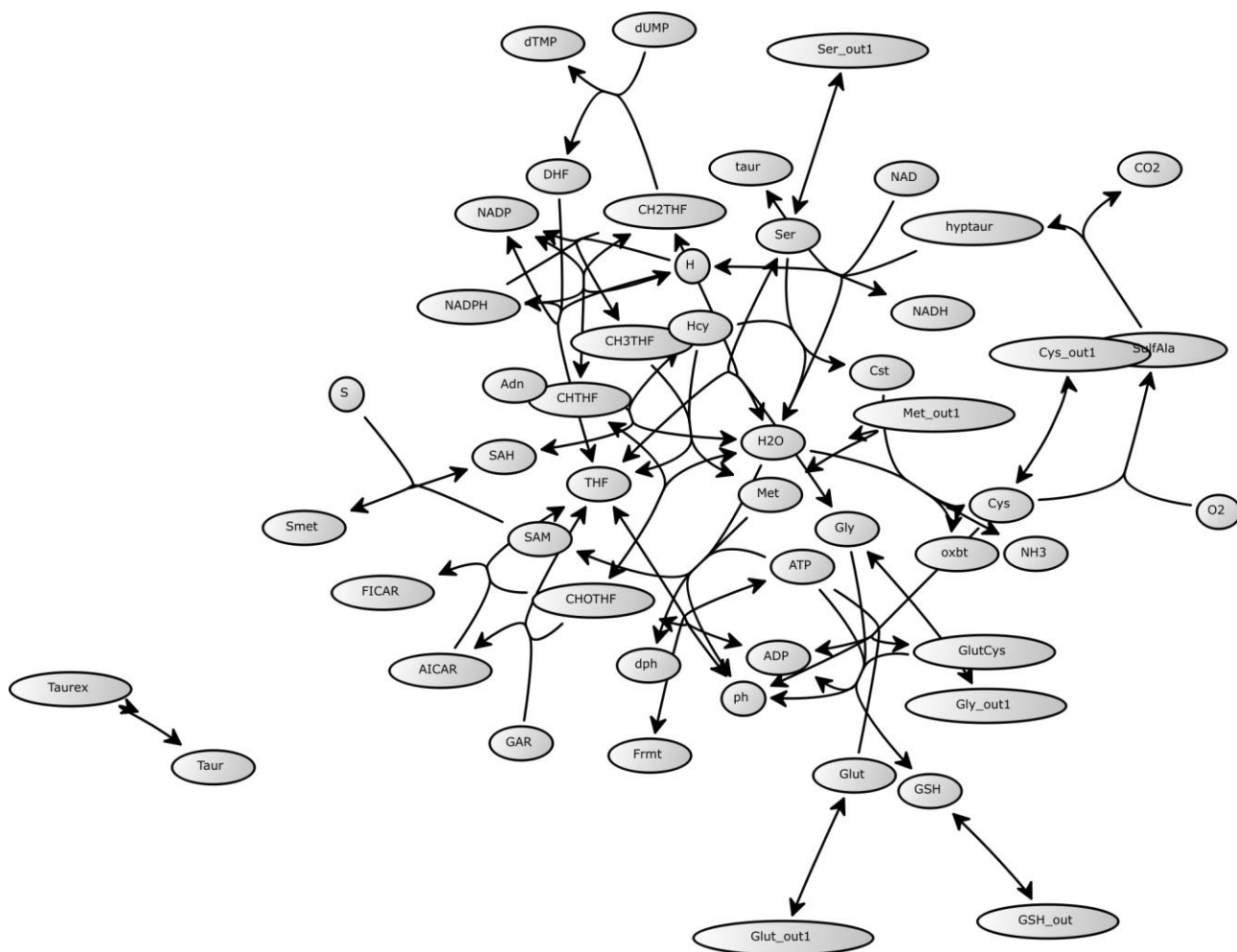
№	Реакції, що входять в групу	Бруто рівняння
1	TS DHFR -SAHN -MAT -Methylases -MTHFR -MS	dUMP + ATP + Adn + Smet + dph = dTMP + 2 ADP + S + ph

Продовження таблиці 3.5

2	CD 2SADC 2 Taur_transp 2 htDH -2 Cys_transp	$2 O_2 + 2 ADP + 2 NAD + 2 ph + 2 Cys = 2 ATP + 2 CO_2 + 2 NADH + 2 H + 2 Taur$
3	2TS 2DHFR 2MTD 2MTCH -PGT -AICART	$dUMP + 2 ATP + 4 NADPH + 4 H + FICAR = 2 dTMP + 2 ADP + 4 NADP + 2 ph + GAR$
4	PGT AICART 2 FTS	$ATP + GAR + 2 (HCO_2)^- = 2 ADP + ph + FICAR$
5	Ser_transp Met_transp SHMT -TS - DHFR	$dTMP + ADP + NADP + ph + Gly = dUMP + ATP + NADPH + H + Ser$
6	MTHFR MS -CBS -CTGL -CD - SADC -TS -DHFR -Taur_transp - htDH Ser_transp - Met_transp	$dTMP + ATP + CO_2 + NADH + H + NH_3 + oxobutanoate + Taur = Met + dUMP + O_2 + ADP + NAD + ph + Ser$

**Примітка.** Реакції, що входять в групу, позначені за назвою ензиму, який їх каталізує; знак « $\leftrightarrow$ » означає, що реакція відбувається у зворотному напрямку; число перед символом ензиму відображає відносний рівень потоку (стехіометричний коефіцієнт) через ту чи іншу реакцію для підтримання умовно стаціонарного стану системи. Брутто рівняння: число перед символом метаболіту відповідає стехіометричному коефіцієнту, його відсутність – коефіцієнт дорівнює одиниці. Ці рівняння є векторами, які обмежують простір і всі значення потоків досліджуваної мережі, а в біологічних термінах характеризують фенотип системи.

**3.4.4 Визначення структури мережі за допомогою програмного забезпечення Metatool.** Структура мережі в графічному вигляді зображується сіткою, в якій елементи (вузли мережі) пов'язані між собою ребрами мережі або стрілками (рис. 3.1). За кількістю зв'язків, притаманних кожному елементу, вирізняються вузли з більшим або меншим числом зв'язків, що відповідає залученню того чи іншого метаболіту в реакціях системи.



**Рис. 3.1** Топологія мережі фолат-залежного метаболізму.

До центру графа тяжіють ключові метаболіти, що мають найбільшу кількість зв'язків з іншими метаболітами. Реакція транспорту таурину функціонує незалежно від решти реакцій фолат-залежного метаболізму. Скоріш за все це пов'язано з процесом дифузії таурину, який відбувається за градієнтом концентрації і мало залежать від реакцій фолат-залежного

метаболізму.

Наявність мережі дає можливість визначити як зв'язані між собою елементи (connectivity), варіабельність зв'язків, тобто через які метаболіти два елементи можуть бути зв'язаними між собою і яка довжина цих різних шляхів, тобто яка кількість проміжних реакцій необхідна для того, щоб із субстрату отримати продукт реакції. В біології це відповідає альтернативним шляхам метаболізму.

Для отримання цієї інформації програма Metatool перебирає всі можливі комбінації початкових реакцій, записаних у відтвореній стехіометричній матриці системи (Додаток А), і об'єднує їх у групи за критерієм участі в реакціях найбільшого числа однакових метаболітів. Результат надається у вигляді груп реакцій, об'єднаних за цим критерієм. У досліджуваній системі було виявлено 12 таких груп (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Реакції, об'єднані в групи за критерієм спільності метаболітів

№ групи	Реакції, що входять в групу	Брутто рівняння
1	GCL GSS	$2 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ ATP} = 2 \text{ ADP} + 2 \text{ ph}$
2	MAT Methylases SAHH	$\text{Met} + 2 \text{ H}_2\text{O} + \text{ATP} + \text{S} = \text{Hcy} + \text{Adn} + \text{Smet} + \text{ph} + \text{dph}$
3	MTHFR MS	$\text{Hcy} + \text{CH}_2\text{THF} + \text{NADPH} + \text{H} = \text{Met} + \text{THF} + \text{NADP}$
4	CBS CTGL Met_transp	$\text{Hcy} + \text{Ser} + \text{Met} = \text{Met} + \text{Cys} + \text{NH}_3 + \text{oxobutanoate}$
5	CD SADC Taur_transp htDH	$\text{H}_2\text{O} + \text{Cys} + \text{O}_2 + \text{NAD} = \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H} + \text{Taur}$
6	PGT AICART	$\text{CHOTHF} + \text{GAR} = 2 \text{ THF} + \text{FICAR}$
7	TS DHFR	$\text{CH}_2\text{THF} + \text{dUMP} + \text{NADPH} + \text{H} = \text{THF} + \text{dTMP} + \text{NADP}$
8	Serine_transp	$\text{Ser in} = \text{Ser out}$
9	- Gly_transp SHMT	$\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{THF} + \text{Gly} = \text{THF} + \text{Ser}$
10	Cysteine in/out	$\text{Cys in} = \text{Cys out}$
11	MTD MTCH	$\text{CHOTHF} + \text{NADPH} + \text{H} = \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_2\text{THF} + \text{NADP}$
12	FTS	$\text{THF} + \text{ATP} + (\text{HCO}_2) = \text{CHOTHF} + \text{ADP} + \text{ph}$

**Примітка:** Реакції позначені за назвою ензиму, який їх каталізує, а знак «←→»

означає, що реакція відбувається у зворотному напрямку. Число перед символом метаболіту у похідних реакціях відповідає стехіометричному коефіцієнту, його відсутність – коефіцієнт дорівнює одиниці

Якщо підсумувати ліві і праві половини рівнянь реакцій у кожній групі, то отримаємо групи бруто-рівнянь, у яких замість назв реакцій будуть метаболіти зі стехіометричними коефіцієнтами. Ці рівняння є векторами можливих перетворень *ключових метаболітів* (Таблиця 3.6). Необхідно зазначити, що окрім об'єднання реакцій за наведеним критерієм, відбувається перевірка відповідності отриманих векторів загальній вимозі щодо умовно стаціонарного стану системи. Для більшої наочності отриманий результат наведений у вигляді матриці, у якій стовпчики відповідають групам реакцій, а рядки – ключовим метаболітам вислідних рівнянь у цих групах (Таблиця 3.7). Матриця дає можливість просто підрахувати скільки раз той чи інший ключовий метаболіт задіяний в цих групах. Знак «+» або «-» вказує відповідно на продукт або субстрат реакції.

Таблиця 3.7

Матриця ключових метаболітів

Метаболіти	Групи, в яких реакції об'єднані за критерієм спільності метаболітів											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
THF	0	0	1	0	0	2	1	0	1	0	0	-1
CH <sub>2</sub> THF	0	0	-1	0	0	0	-1	0	-1	0	1	0
CH <sub>3</sub> OTHF	0	0	0	0	0	-2	0	0	0	0	-1	1
Cys	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	-1	0	0
Ser	0	0	0	-1	0	0	0	-1	1	0	0	0
Met	0	-1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hcy	0	1	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
H <sub>2</sub> O	-2	-2	0	0	-1	0	0	0	-1	0	1	0

**Примітка:** Номери стовпчиків відповідають номерам груп в таблиці 3.6.

Таким чином сім метаболітів, не враховуючи воду, належать до ключових і наведені у спадному порядку за частотою їх участі в реакціях (таблиця 3.7): THF (6), CH<sub>2</sub>THF (4), CHOTHF (4). Met (3), Hcy (3), Ser (3) і Cys (3). Роль ключових метаболітів фолатного циклу можна простежити, аналізуючи загальну схему реакцій (Рис.1.1). Метилентетрагідрофолат, формілтетрагідрофолат і тетрагідрофолат тісно пов'язані між собою реакціями взаємоперетворення. Метилентетрагідрофолат необхідний для синтезу тимідилату, є попередником метилтетрагідрофолату у реакції відновлення і через нього пов'язаний з метіоніновим циклом. Формілтетрагідрофолат надає формільну групу в пуринове кільце на третій і передостанній стадії його синтезу. Від метіоніну, а точніше від його похідного, S-аденозилметіоніну залежать всі процеси метилювання. Гомоцистеїн є проміжним метаболітом між метіоніновим циклом і процесом транссульфування. Цистеїн – продукт транссульфування і субстрат для синтезу глутатіону. Серин є основним постачальником одновуглецевих фрагментів у фолатний цикл, а саме в реакцію утворення метилентетрагідрофолату (CH<sub>2</sub>THF) із тетрагідрофолату (THF). Він також постачає вуглецевий скелет цистатіоніну в реакції транссульфування гомоцистеїну.

**3.4.5. Визначення елементарних мод.** Наступним кроком після визначення меж та структури метаболічної мережі є визначення елементарних мод тобто унікального набору найменших підмереж, які забезпечують функціонування системи в умовно стаціонарному стані. Кожна елементарна мода складається з мінімального переліку реакцій, які забезпечують її функціонування як окремої незалежної і неподільної одиниці. Якщо вилучити хоча б одну реакцію з елементарної моди, то вона втратить свої властивості функціональної одиниці і не буде відповідати вимогам умовно стаціонарного стану. Програма Metatool визначає послідовності всіх реакцій, які утворюють найкоротші шляхи від субстрату до продукту серед всіх альтернативних

шляхів. Ці послідовності реакцій об'єднуються в групи. Рівняння лівих і правих половин цих об'єднаних реакцій підсумовуються, внаслідок чого отримують метаболіти, через які проходить найкоротший шлях між початковим метаболітом і його кінцевим продуктом. Серед 27 реакцій виокремлено 23 елементарних моди. Елементарні моди в таблиці 3.8 наведені в порядку збільшення ланок в моді. Кількість ланок в моді визначають довжину останньої.

Таблиця 3.8

Елементарні моди метаболічної системи

№ п/п	Довжина моди	Реакції в елементарних модах потоків
1	3	(1 AICART) (2 FTS) (1 PGT)
2	5	(1 CD) (1 Cys_transp) (1 htDH) (1 SADC) (1 Taur_transp)
3	5	(1 DHFR) (-1 Gly_transp) (1 Ser_transp) (1 SHMT) (1 TS)
4	5	(1 DHFR) (1 FTS) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 TS)
5	6	(1 Cys_transp) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 Gly_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp)
6	6	(1 FTS) (1 Gly_transp) (-1 MTCH) (-1 MTD) (-1 Ser_transp) (-1 SHMT)
7	7	(1 AICART) (-2 Gly_transp) (2 MTCH) (2 MTD) (1 PGT) (2 Ser_transp) (2 SHMT)
8	8	(1 CBS) (1 CTGL) (-1 Cys_transp) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (1 SAHH) (1 Ser_transp)
9	8	(-1 Gly_transp) (1 MAT) (1 Methylases) (1 MS) (1 MTHFR) (1 SAHH) (1 Ser_transp) (1 SHMT)
10	8	(1 FTS) (1 MAT) (1 Methylases) (1 MS) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 MTHFR) (1 SAHH)
11	9	(1 Cys_transp) (1 DHFR) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 GSS) (-1 GSH_out) (1 Ser_transp) (1 SHMT) (1 TS)
12	10	(1 Cys_transp) (-1 FTS) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (1 MTCH) (1 MTD) (1 Ser_transp) (1 SHMT)
13	11	(1 CBS) (1 CD) (1 CTGL) (1 htDH) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (1 SADC) (1 SAHH) (1 Ser_transp) (1 Taur_transp)



Продовження таблиці 3.8

14	11	(1 AICART) (2 Cys_transp) (2 GCL) (2 Glut_transp) (2 GSS) (-2 GSH_transp) (2 MTCH) (2 MTD) (1 PGT) (2 Ser_transp) (2 SHMT)
15	12	(1 CBS) (1 CTGL) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 Gly_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (1 SAHH) (1 Ser_transp)
16	12	(1 Cys_transp) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (1 MAT) (1 Methylases) (1 MS) (1 MTHFR) (1 SAHH) (1 Ser_transp) (1 SHMT)
17	12	(1 CBS) (1 CTGL) (-1 Cys_transp) (1 FTS) (1 Gly_transp) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 SAHH) (-1 SHMT)
18	14	(1 CBS) (1 CTGL) (1 DHFR) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (1 SAHH) (2 Ser_transp) (1 SHMT) (1 TS)
19	14	(1 CBS) (1 CTGL) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (2 MAT) (1 Met_transp) (2 Methylases) (1 MS) (1 MTHFR) (2 SAHH) (2 Ser_transp) (1 SHMT)
20	15	(1 CBS) (1 CD) (1 CTGL) (1 FTS) (1 Gly_transp) (1 htDH) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 SADC) (1 SAHH) (-1 SHMT) (1 Taur_transp)
21	15	(1 CBS) (1 CTGL) (1 FTS) (1 GCL) (1 Glut_transp) (2 Gly_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (-1 MTCH) (-1 MTD) (1 SAHH) (-1 SHMT)
22	15	(1 CBS) (1 CTGL) (-1 FTS) (1 GCL) (1 Glut_transp) (1 GSS) (-1 GSH_transp) (1 MAT) (1 Met_transp) (1 Methylases) (1 MTCH) (1 MTD) (1 SAHH) (2 Ser_transp) (1 SHMT)
23	16	(1 AICART) (2 CBS) (2 CTGL) (2 GCL) (2 Glut_transp) (2 GSS) (-2 GSH_transp) (2 MAT) (2 Met_transp) (2 Methylases) (2 MTCH) (2 MTD) (1 PGT) (2 SAHH) (4 Ser_transp) (2 SHMT)

**Примітка:** реакції позначені за назвою ензиму, який їх каталізує; знак «-» перед назвою реакції вказує на оборотність реакції; число перед символом ензиму відображає відносний рівень потоку, який проходить через ту чи іншу реакцію для підтримання умовно стаціонарного стану системи.

Найкоротша мода містить 3 реакції, а найдовша — 16. За частотою участі тієї чи іншої реакції в різних елементарних модах можна зробити висновок щодо важливості даної реакції для цілої системи. Найчастіше в

модах зустрічається реакція, яку каталізує серингідроксиметилтрансфераза і супутня їй реакція постачання в систему серину (участь у 15 модах з 23-х). Серин постачає однуглицеві групи для тетрагідрофолатного циклу, а через реакцію MTHFR і далі через реметилування гомоцистеїну однуглицевий фрагмент використовується для синтезу метіоніну з гомоцистеїну. Серин є також субстратом у реакції транссульфування гомоцистеїну з утворенням цистатіоніну. У тринадцяти з двадцяти трьох мод присутні реакції метіонінового циклу, які забезпечують утворення S-аденозилметіоніну і метилування. Для порівняння лише в трьох модах присутні реакції синтезу таурину, при цьому одна з цих мод містить виключно набір реакцій тауринового синтезу (мода №2). Це свідчить про відносну незалежність тауринового синтезу від тетрагідрофолатного і метіонінового циклів, а саме про можливість функціонування шляху синтезу таурину навіть при зупинці реакцій інших ланок фолат-залежного метаболізму.

Визначені елементарні моди є унікальною характеристикою системи.

**Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:**

Родрігес Р., Лущик І., Оболенська М. Стехіометрична модель фолатзалежного метаболізму однуглицевих груп у плаценті людини. Укр. біохім. журн. 2012; 84 (4): 20-31.

### **3.5 Баланс метаболічних потоків у фолат-залежних процесах**

#### **3.5.1 Функціонування системи за початкових умов**

На підставі введених базових обмежень (принципи умовної стаціонарності системи, закон збереження мас і  $v \geq 0$ ) і використовуючи додатковий принцип оптимальності (об'єктивна функція – максимально ефективна робота системи) визначається питома вага потоків в системі за початкових умов і за умов симуляції. Проаналізовано 4 варіанти функціонування системи – умовно стаціонарний стан, тобто фізіологічний

рівень гомоцистеїну і С677С носійство гена *MTHFR* (дикий тип), і три варіанти, які симулюють: двократне збільшення концентрації гомоцистеїну при С677С генотипі *MTHFR*; гетерозиготне С677Т-носійство гена *MTHFR* і фізіологічний рівень гомоцистеїну, і гетерозиготне С677Т-носійство гена *MTHFR* в комбінації з підвищеною в два рази концентрацією гомоцистеїну.

Після введення базових обмежень щодо функціонування системи в умовно стаціонарному стані, з'ясування ключових метаболітів і елементарних мод можна визначити внесок кожного(ої) із потоків (реакцій) в метаболічну систему. Це визначення базується на додатковому припущенні щодо здатності системи до оптимізації її роботи в будь-яких умовах її існування (161,162). В якості цільової функції обирали максимум потоків через усі реакції системи. Програма YANA визначає як часто зустрічається та чи інша реакція в елементарних модах, враховує розташування вектора реакції у багатовимірному просторі системи, введені базові обмеження, критерій оптимальності роботи системи і на цій основі визначає внесок кожної реакції в систему в умовних відносних одиницях. Результати наведені в таблиці 3.9 і рисунку 3.2.

Таблиця 3.9

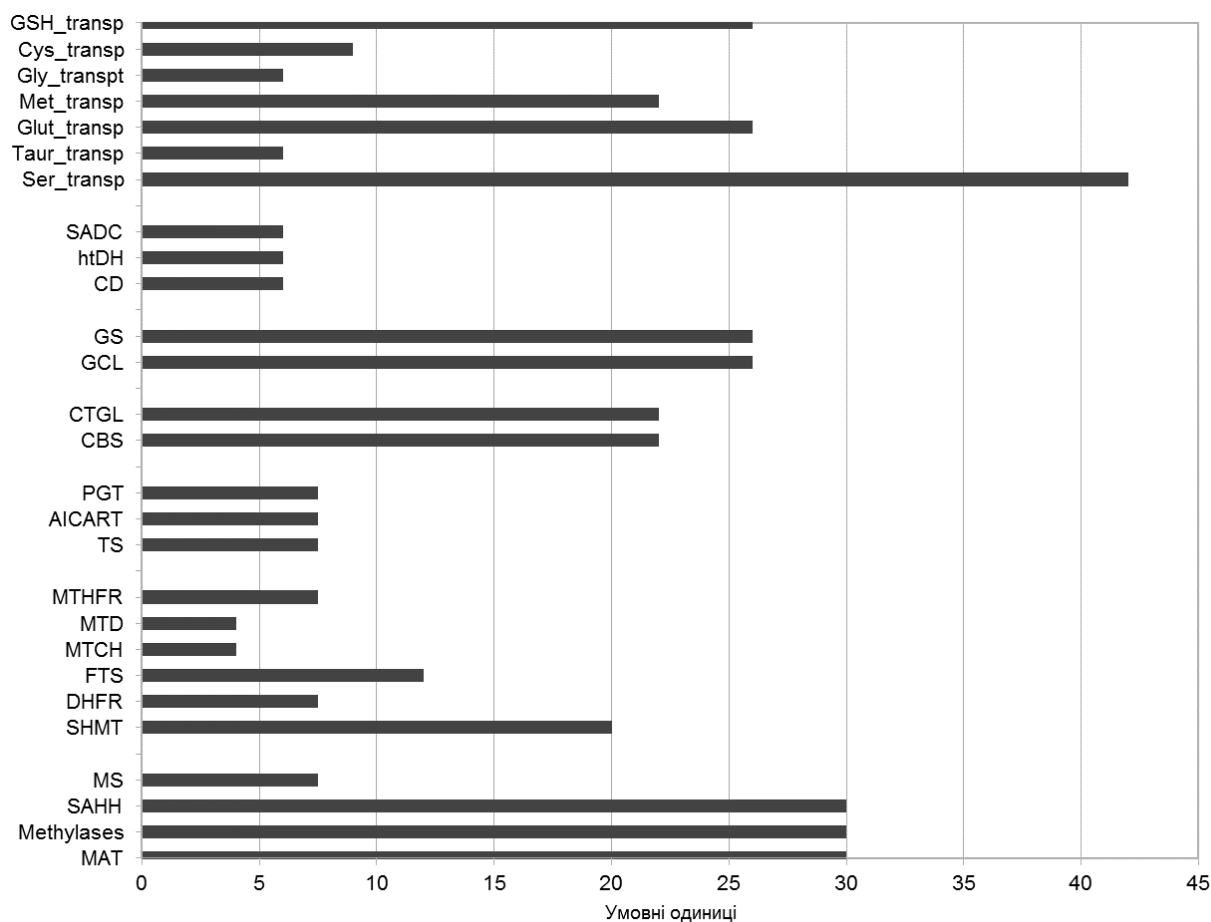
Питома вага потоків у фолат-залежній системі (в умовних одиницях)

№ п/п	Потоки реакцій	Початкові дані	Симуляція системи		
			С667Т <i>MTHFR</i>	2х Нсу	С667Т <i>MTHFR</i> & 2х Нсу
Реакції метіонінового циклу					
1	MAT	30	28,5	33,6	32,4
2	Methylases	30	28,5	33,6	32,4
3	SAHH	30	28,5	33,6	32,4
4	MS	7,5	5,25	8,4	5,92

Продовження таблиці 3.9

Реакції тетрагідрофолатного циклу					
5	SHMT	20	14	22,4	15,8
6	DHFR	7,5	9,45	2,1	3,9
7	FTS	12	15,12	3,36	6,24
8	MTCH	4	4,04	3,36	3,36
9	MTD	4	4,32	2,8	3,04
10	MTHFR	7,5	7,2	5,85	5,4
Реакції синтезу пуринів та піримідинів					
11	TS	7,5	8,1	5,25	5,7
12	AICART	7,5	8,1	5,25	5,7
13	PGT	7,5	8,1	5,25	5,7
Реакції транссульфування					
14	CBS	22	22,9	24,64	25,96
15	CTGL	22	22,9	24,64	25,96
Реакції перетворення глутатіону					
17	GCL	26	26,52	23,4	23,92
19	GSS	26	26,52	23,4	23,92
Реакції синтезу таурину					
20	CD	6	6,48	5,58	6,06
21	htDH	6	6,48	5,58	6,06
22	SADC	6	6,48	5,58	6,06
Реакції входу і виходу метаболітів					
23	Ser_transp	42	45,36	39,06	40,32
24	Taur_transp	6	6,24	6,72	6,06
25	Glut_transp	26	26	11,7	23,92
26	Met_transp	22	22,44	19,8	25,96
27	Gly_transpt	6	6	5,76	9,36
28	Cys_transp	9	10,8	11,7	3,6
29	GSH_transp	26	26,52	23,4	23,92

**Примітка.** Початкові дані – дикий тип MTHFR і фізіологічна концентрація гомоцистеїну; C667T MTHFR – мутована форма MTHFR і фізіологічна концентрація гомоцистеїну; Hcy x 2 - вдвічі збільшений потік SAHH→Hcy і C667T MTHFR & Hcy x2 - мутована форма MTHFR і вдвічі збільшений потік SAHH→Hcy



**Рис. 3.2** Баланс потоків у стаціонарному стані системи за початковими даними.

Як видно з Рис. 3.2, за початковими даними найбільший потік проходить через транспорт серину, а далі по спадній послідовності розташовуються групи реакцій метіонінового циклу і SAH-гідролази, окрім синтезу метіоніну, група реакцій, пов'язаних з синтезом і виходом глутатіону, група реакцій, до якої входять реакції транссульфування, реакції надходження метіоніну, реакції фолатного циклу і, нарешті реакції, пов'язані з синтезом таурину.

**3.5.2 Баланс фолат-залежних потоків після симуляції підвищеної концентрації гомоцистеїну в системі.** Узвичасним показником порушень фолат-залежних процесів є гіпергомоцистеїнемія. Цей показник асоціюється з численними захворюваннями людини, зокрема ускладненнями під час вагітності. Концентрація гомоцистеїну в крові вагітних за умов фізіологічного

перебігу вагітності нижча за концентрацію у невагітних (78). Однак при ускладненні вагітності прееклампсією вона згодом сягає 20 – 30  $\mu\text{M}$  проти 5 – 11  $\mu\text{M}$  в контрольній групі (163,164). Підвищений вміст гомоцистеїну, щонайменше в два рази, був визначений не тільки в крові, а також і в зразках плаценти при ускладненні вагітності прееклампсією (71).

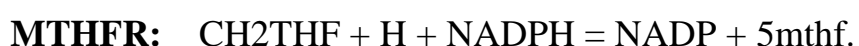
Наші попередні дослідження показали, що за умов прееклампсії і при носійстві *C667T MTHFR* генотипа рівень гомоцистеїну в плаценті вищий, ніж за умов *C667C MTHFR* генотипа і прееклампсії і вищий, ніж в плаценті при фізіологічному перебігу вагітності (4). Початково навантаження гомоцистеїном планували моделювати введенням додаткової транспортної реакції ззовні, але в силу обмеженості стехіометричної моделі в результаті ми отримали лише зростання зворотного потоку оборотної реакції SAHH в бік утворення SAH та інгібування метіонінового циклу, без змін в інших потоках системи, що не відповідало експериментальним даним. Тому ми вдалися до ендogenous джерела гомоцистеїну: верхню межу потоку SAHH:  $\text{H}_2\text{O} + \text{SAH} = \text{Adn} + \text{Hcy}$  збільшено вдвічі. Оскільки об'єктивна функція моделі – це максимізація всіх потоків, то пряма реакція  $\text{SAHH} \rightarrow \text{Hcy}$  активізується.



Двократне навантаження системи гомоцистеїном призводить до зниження на 72% потоку через реакції MTCH і MTD, які ведуть до утворення 10-формілтетрагідрофолату, метаболіту, необхідного для синтезу *de novo* азотистого кільця пуринових нуклеотидів. Знижуються на 30% потоки через реакції AICART і PGT, а також через реакцію TS - синтезу тимідинмонофосфату з уридинмонофосфату, і реакцію DHFR - відновлення дігідрофолату до тетрагідрофолату, Загалом знижуються потоки через всі реакції фолатного циклу окрім MTHFR. Натомість активуються шляхи реметилування та транссульфування. Однак шляхи синтезу глутатіону і таурину не змінюються, хоча опосередковано пов'язані з транссульфуванням.

**3.5.3 Баланс фолат-залежних потоків після симуляції носійства C677T мутації гена метилентетрагідрофолат редуктази.** Фолатний цикл тісно пов'язаний з метіоніновим циклом через метилтетрагідрофолат (5-mTHF), який є донором метильної групи для реакції реметилування гомоцистеїну. 5-mTHF утворюється внаслідок відновлення CH<sub>2</sub>THF за участі метилентетрагідрофолатредуктази. Цей ензим належить до поліморфних. Його алельна форма з C677 → T677-заміною (аланін 222 → валін 222) відзначається меншою активністю через підвищену термолабільність ензиму й асоціюється з підвищеним рівнем гомоцистеїну та високим ризиком виникнення ускладнень під час вагітності (77,165–167). В разі наявності гетерозиготи C677T або гомозиготи T/T активність ензиму знижується до 65% і 30%, відповідно, в порівнянні зі 100% активністю C677C гомозигот (168). Мутована форма ензиму зустрічається з частотою близько 50% в європейській популяції (168) і в Україні (71).

Для з'ясування системних змін у фолат-залежних процесах за умов розповсюдженого C677T генотипу *MTHFR* було цілеспрямовано задано 65% значення потоку. Реакція позначена в переліку початкових даних як MTHFR (Таблиця 3.4)



Внаслідок введення такого додаткового обмеження системи знижується потік через реакцію реметилування, що майже не впливає на інші потоки метіонінового циклу. Дещо знижується потік через серингідроксиметилтрансферазу, яка постачає в систему гліцин, але це компенсується зростанням імпорту гліцину ззовні. Завдяки цьому потік, який визначає синтез глутатіону, не змінюється. MTHFR конкурує з MTD і TS за 5,10-метилентетрагідрофолат, тому, коли активність MTHFR знижена більше 5,10-метилентетрагідрофолат стає доступним для MTD, цим пояснюється

збільшення потоку через реакцію MTD і пов'язану з нею реакцією MTCH. Це опосередковано призводить до невеликого зростання потоків через реакції PGT і AICART. Ймовірно, що через більшу доступність 5,10-метилентетрагідрофолат збільшується потік через реакцію синтезу тимідинмонофосфату, TS. За низького значення потоку MTHFR, більше навантаження по утилізації гомоцистеїну лягає на шлях транссульфування, опосередкований CBS і CTGL. Втім, оскільки за початкових умов потік MTHFR значно менший, ніж потоки CBS і CTGL, то активація шляху транссульфування всього на 4% компенсує втрату активності MTHFR. Наступні етапи перетворення цистеїну, а саме синтез таурину і глутатіону зростають на незначну величину - на 8 і 2 відсотки, відповідно. Детально дані представлені в таблиці 3.10.

Таблиця 3.10

Зміни потоків через реакції фолат-залежного метаболізму (у % відносно початкових умов)

Номер п/п	Потік	2x Hcy	MTHFR C677T генотип	2x Hcy + MTHFR C677T
Реакції метіонінового циклу				
1	MAT	112	95	108
2	Methylases	112	95	108
3	SAHH	112	95	108
4	MS	112	70	79
Реакції фолатного циклу				
5	MTHFR	112	70	79
6	MTD	28	126	52
7	MTCH	28	126	52



Продовження таблиці 3.10

8	FTS	84	101	84
9	DHFR	70	108	76
10	SHMT	78	96	72
Реакції синтезу попередників нуклеїнових кислот				
11	PGT	70	108	76
12	AICART	70	108	76
13	TS	70	108	76
Реакції транссульфування				
14	CBS	112	104	118
15	CTGL	112	104	118
Реакції синтезу таурину				
16	CD	93	108	101
17	SADC	93	108	101
18	htDH	93	108	101
Реакції синтезу глутатіону				
19	GCL	90	102	92
20	GSS	90	102	92
Транспортні реакції				
21	Taur_out	93	108	101
22	Met_in	112	104	118
23	Cys_in	45	100	40
24	Glut_in	90	102	92
25	Ser_in	96	100	96
26	Gly_in	130	120	156
27	GSH_out	90	102	92

**Примітка.** Значення метаболічних потоків через реакції системи за різних умов симуляції наведено у відносних одиницях. За 100 % прийняті значення потоків у вихідному стані. Нсу — гомоцистеїн.

**3.5.4 Баланс фолат-залежних потоків після симуляції мутації в гені *MTHFR* і підвищеного рівня гомоцистеїну.** Дослідження фолат-залежних процесів в плаценті людини за умов фізіологічного перебігу вагітності і

ускладнення прееклампсією, проведені в нашій лабораторії системної біології, виявили суттєві зміни в цих процесах за умови збігу декількох факторів. А саме в зразках з клінічним діагнозом прееклампсія наявність С677Т генотипу *MTHFR* і вдвічі збільшеної концентрації гомоцистеїну поєднувалися з вдвічі меншим вмістом фолатів, метіоніну і появою неочікуваної кореляції з високим ступенем вірогідності між амінотіолами і фолатами (71).

Для системного аналізу змін у фолат-залежних процесах за цих умов було проведено відповідне симулювання системи, а саме:

верхню межу потоку **SAHH**:  $H_2O + SAH \leftrightarrow Adn + Hcy$  збільшено вдвічі;  
а потоку **MTHFR**:  $CH_2THF + H + NADPH = NADP + 5mthf$  було надано значення, яке складало 65% від вихідного.

Навантаження гомоцистеїном в разі носійства гетерозиготної форми *MTHFR* призводить до майже зворотної ситуації: потік через CBS зростає, поглинаючи надлишок гомоцистеїну за меншої «допомоги» з боку метіонінсинтази, MS. При зростанні потоку CBS збільшується і витрата ним серину, забираючи цей субстрат у SHMT, що виявляється у зниженні продукції  $CH_2THF$  серингідроксиметилтрансферазою. Саме тому ми спостерігаємо зниження потоків MTD, MTCH і пов'язаних з ними PGT і AICART.

**Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:**

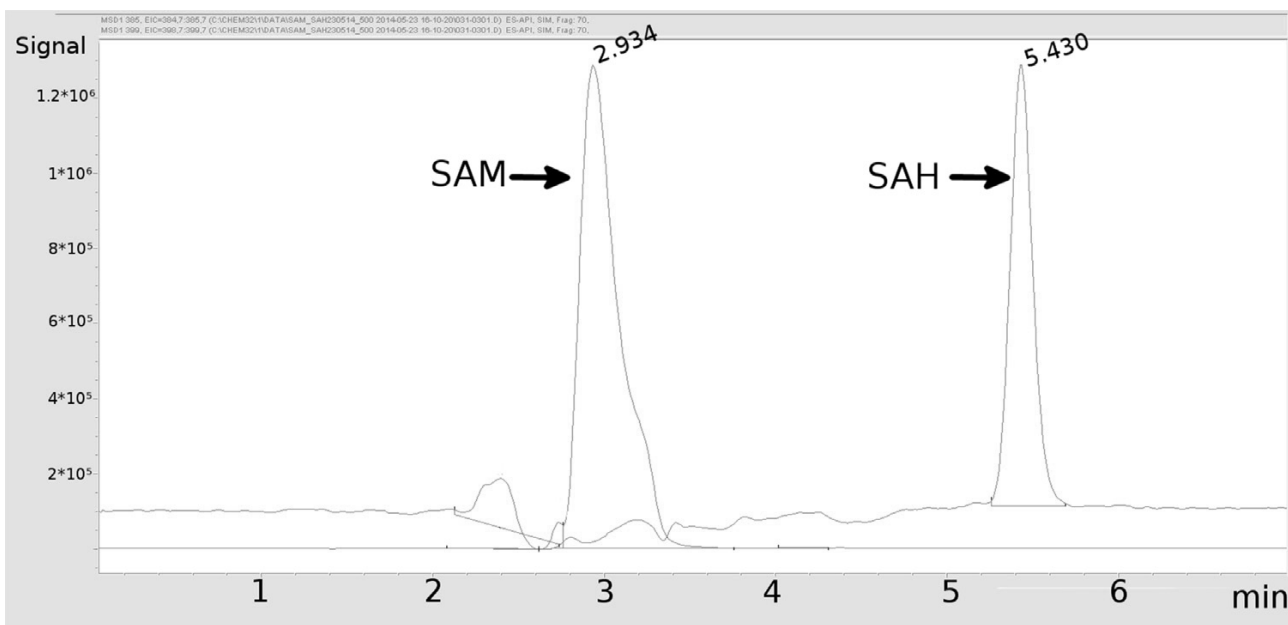
Родрігес Р., Лущик І., Оболенська М. Стехіометрична модель фолатзалежного метаболізму одновуглецевих груп у плаценті людини. Укр. біохім. журн. 2012; 84 (4): 20-31.

### **3.6 Експериментальна перевірка передбачень на основі стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму**

Прогнози, зроблені на основі стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму в плаценті людини, були перевірені експериментально. Плацентарні експланти були культивовані в присутності двох концентрацій гомоцистеїну, 20  $\mu\text{M}$  і 40  $\mu\text{M}$ , які імітують легку і середню форми гіпергомоцистеїнемії. За допомогою аналітичного методу високоефективної рідинної хроматографії/іонізації електроспреем/мас-спектрометрії (ВЕРХ/ЕРІ/МС) визначали як впливають вказані концентрації гомоцистеїну на утворення пуринів *de novo* і на вміст S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну.

#### **3.6.1 Потенціал метилювання в плаценті людини за умов гіпергомоцистеїнемії.**

**3.6.1.1 Характеристики методу ВЕРХ/ЕРІ/МС для кількісного визначення SAM і SAH.** Хроматограми стандартів SAM і SAH і виділених з тканини плаценти та її експлантів були отримані методом рідинної хроматографії, поєднаної з мас-спектрометрією, у режимі моніторингу індивідуальних іонів (SIM, single ion monitoring). Основними піками в спектрах були протоновані молекулярні іони  $[\text{M} + \text{H}]^+$  зі значеннями  $m/z$  399 для SAM і 385 для SAH. Метод продемонстрував достатню роздільну здатність щодо аналітів із часом утримування SAM 2,9 хв та часом утримування SAH 5,4 хв. (Рис. 3.3).



**Рис. 3.3** Хроматограма суміші SAM ( $2 \times 10^{-4}$  моль/л) та SAN ( $2 \times 10^{-4}$  моль/л)

**Примітка:** цифри біля кожного піку показують точний час утримання SAM і SAN в концентраціях -  $2 \times 10^{-8}$ ;  $5 \times 10^{-8}$ ;  $2 \times 10^{-7}$ ;  $2 \times 10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-6}$ ;  $10 \times 10^{-6}$  і  $2 \times 10^{-5}$  моль/л тричі вимірювали для побудови калібрувальних кривих.

Рівняння кривої калібрування відповідає формулі  $y = bx + c$ , де  $y$  представляє площу піку аналіту, а  $x$  - концентрацію аналіту. Метод показав хороші лінійні характеристики, див. Таблицю 3.11

*Таблиця 3.11*

Характеристики методу ВЕРХ/ЕРІ/МС для кількісного визначення SAM і SAN

Аналіти	Рівняння	Коефіцієнт кореляції, $R^2$	Діапазон визначення (моль/л)	Поріг визначення, LOD (моль/л)	Поріг кількісного визначення LOQ (моль/л)
SAM	$y = 2783.9 \times A + 40.00$	0.99998	$2 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-5}$	$1.4 \cdot 10^{-9}$	$9.3 \cdot 10^{-9}$
SAN	$y = 1147.3 \times A - 177.34$	0.99997	$2 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-5}$	$6.4 \cdot 10^{-9}$	$1.1 \cdot 10^{-8}$

**Примітка.**  $y$  - площа піку;  $A$  - пікомоль в 50 мкл зразка, введеного на колонку C18. LOD та LOQ - це відповідно нижні межі виявлення та кількісної оцінки аналітів.

Тестування на стабільність сполук показало зниження на 7%

інтенсивності сигналу SAM через 3 години зберігання при кімнатній температурі ( $9,27 \times 10^{-6}$  проти початкової  $10,00 \times 10^{-6}$  моль/л) і зниження на 13% протягом 6 годин ( $8,72 \times 10^{-6}$  проти початкової  $10,00 \times 10^{-6}$  моль/л). Іntenсивність сигналу SAN зменшилась на 9% за 3 години ( $1,37 \times 10^{-4}$  проти початкової  $1,51 \times 10^{-4}$  моль/л) і на 11% протягом 6 годин ( $1,34 \times 10^{-4}$  проти  $1,51 \times 10^{-4}$  моль/л).

Повторюваність методу впродовж одного дня оцінювали двома послідовними вимірюваннями суміші стандартів SAM і SAN,  $5 \times 10^{-6}$  моль/л кожної сполуки.

Отримані значення CV складали 1,5% для SAM ( $4,9 \pm 0,07 \times 10^{-6}$  моль/л) та 1,9% для SAN ( $4,6 \pm 0,07 \times 10^{-6}$  моль/л).

Ефекти інгібування сигналу матрицею зразка та вихід SAM і SAN після колонки SPE оцінювали за різницею між рівнями ендogenous та екзогенних аналітів. На тлі ендogenous SAM (56,4 пмоль/50 мкл застосованого зразка) у зразках із додаванням екзогенного SAM виявлено 83,43 пмоль/50 мкл SAM. Вихід екзогенного додаткового SAM становив 97% ( $83,43 - 56,4 = 27,03$  пмоль проти очікуваних 28,0 пмоль). Вихід SAN в аналогічному експерименті був в межах 90%.

Вихід стандартів SAM і SAN після колонки SPE становив відповідно 96,5% ( $1,86 \times 10^{-5}$  проти  $1,93 \times 10^{-5}$  моль/л) і 95,5% ( $1,34 \times 10^{-5}$  проти  $1,40 \times 10^{-5}$  моль/л).

Після аналізу зразків стандартів не було виявлено залишків аналітів (ефектів перенесення) в деіонізованій воді.

Всі отримані характеристики кількісної оцінки SAM і SAN узгоджувались з іншими опублікованими даними (169–171). Чутливість методу повністю відповідає потребам рутинного аналізу для зразків плаценти, особливо беручи до уваги, що метод дозволяє уникнути застосування важкодоступних та дуже дорогих пристроїв, таких як тандемні мас-спектрометри (MS/MS).

**3.6.1.2 Вміст SAM і SAH в плаценті та її експлантах.** Концентрація SAM і SAH в плаценті людини представлені в Таблиці 3.12. Наскільки нам відомо, це перша оцінка вмісту SAM і SAH в плаценті людини. Концентрація SAM в плаценті людини перевищує концентрацію SAH. Культивування плацентарних експлантів у культуральному середовищі DMEM-F12 протягом 24 годин призводить до статистично значущого зниження рівня вмісту SAH, при незмінному рівні SAM і підвищення відношення SAM до SAH.

*Таблиця 3.12*

Концентрація SAM і SAH в тканині плаценти і культивованих експлантах плаценти.

Зразки	SAM, нмоль/г (Нижні; верхні квартилі)	SAH, нмоль/г (Нижні; верхні квартилі)	Співвідношення SAM/SAH (Нижні; верхні квартилі)
Тканина плаценти	9.99 (8.33; 18.73)	5.57 <sup>♦♦</sup> (5.20; 8.74)	2.22 <sup>♦♦</sup> (1.86; 2.64)
Експланти	8.44* (7.48; 10.55)	1.07 <sup>♦♦</sup> (1.06; 2.01)	5.53 <sup>♦</sup> (5.17; 7.32)
Експланти + 20μМ Гомоцистеїн	16.3* (8.74; 16.45)	1.8 <sup>♦♦</sup> (1.59; 2.56)	5.92 <sup>♦</sup> (5.69; 6.80)

**Примітка:** концентрація SAM і SAH представлена у нмоль/г свіжої тканини. Величини в одному і тому ж стовпчику позначені однаковими символами різняться з достовірністю  $0.01 < p < 0.05$  (парний тест Вілкоксона для споріднених даних).

В експлантах в присутності гомоцистеїну майже в два рази підвищується концентрація SAM, SAH і при цьому зберігається незмінним співвідношення SAM/SAH.

**Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:**

R. Rodriguez, O. Vakulenko, S. Ralchenko, A. Kostiuk, L. Porublyova, I.

Konovets, I. Voronina, M. Obolenskaya. Quantification of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in human placenta and placental explants under homocysteine treatment. International Journal of Mass Spectrometry. 2017; 421: 279-284.

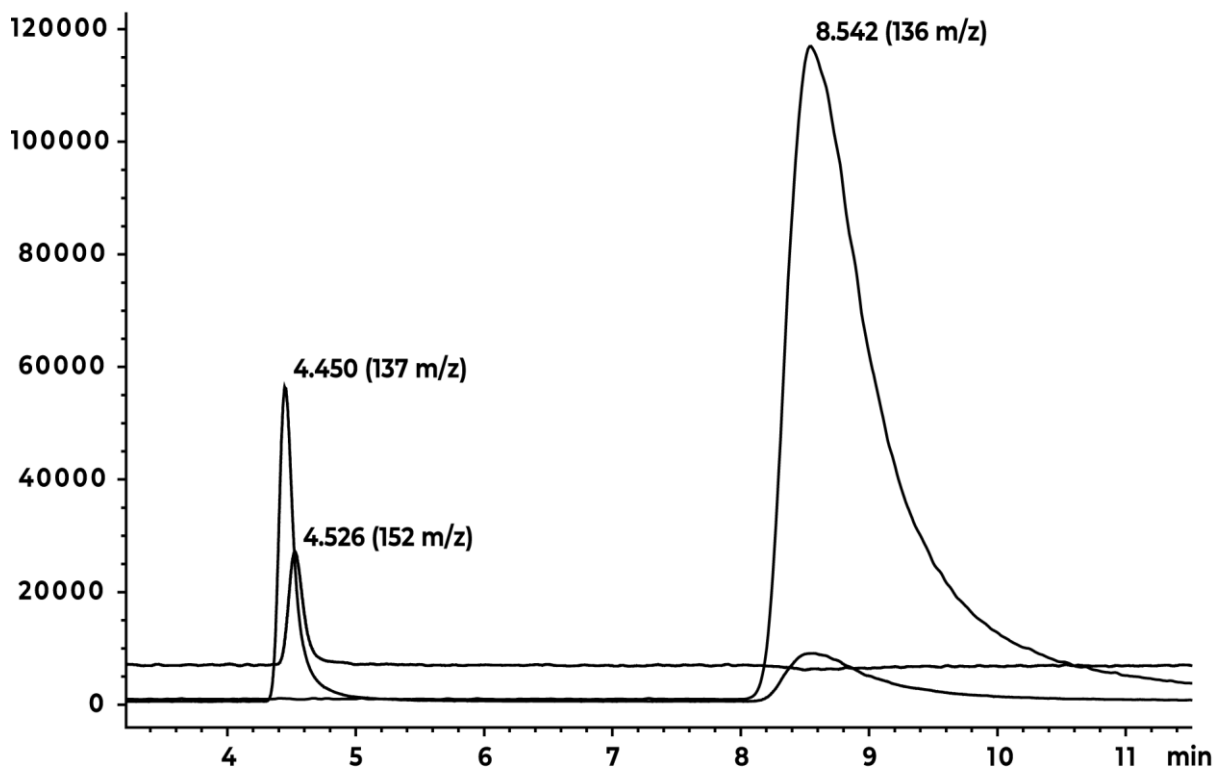
### 3.6.2 Вплив гомоцистеїну на синтез пуринів *de novo*

**3.6.2.1 Налагодження і валідація методу визначення пуринів.** Нами був розроблений метод для визначення концентрації пуринів і інтенсивності синтезу пуринів *de novo* за використання ВЕРХ/ЕРІ/МС. Ефективність виявлення пуринів методом ВЕРХ/ЕРІ/МС залежить від ефективності іонізації та здатності розділяти аналіти з близькими значеннями  $m/z$ . Для досягнення максимальної роздільної здатності методу потрібно було: а) експериментально знайти оптимальний рН мобільної фази, оскільки зниження рН збільшує ефективність іонізації іонами  $H^+$ , але погіршує при цьому хроматографічне розділення аналітів на колонках C18 (172); і б) забезпечити одночасне виявлення слідової концентрації мічених пуринів в присутності значно більшої концентрації немічених. Для досягнення оптимального балансу між ефективною іонізацією та розділенням, ми починали з мобільної фази з рН 2, намагаючись розділити протоновані іони аденіну ( $m/z = 136$ ) і гіпоксантину ( $m/z = 137$ ) і поступово підвищували рН до рН 5, коли було досягнуто достатнє розділення, але з дещо зниженою чутливістю. Про одночасне вимірювання мічених і немічених пуринів йдеться у наступному розділі.

Ми отримали хроматограми сумішей гіпоксантину, гуаніну та аденіну на колонках Zorbax C18 та Zorbax SB-Aq C18 з одноквадрупольними системами MS у режимі Single Ion Monitoring (SIM). Відповідний час утримування (Retention Time, RT) аналітів становив: 8,542 хв для аденіну (136  $m/z$ ), 4,520 для гуаніну (152  $m/z$ ) і 4,450 хв для гіпоксантину (137  $m/z$ ) (Рис.

3.4). Незначний пік аденіну з  $RT = 8,561$  хв на Рис. 3.4 є природним ізотопом  $M + 1$  ( $137 m/z$ ). Обидві колонки чітко відокремлювали аденін від гіпоксантину та гуаніну, тоді як набагато гірше відокремлювали гуанін та гіпоксантин. Кількісне визначення кофеїну ( $195 m/z$ ) проходило в режимі негативної іонізації. Час його утримування становив  $3,8$  хв. Надалі в роботі використовували колонку Zorbax C18.

Валідація методу показала, що інтенсивність сигналу стандартних розчинів аденіну, гіпоксантину та гуаніну не змінювалася протягом місяця зберігання при  $+4^\circ C$ . Повторюваність аналізу впродовж дня перевіряли трьома послідовними вимірюваннями стандартної суміші,  $4 \times 10^{-5}$  моль/л кожної сполуки. Отримані значення CV склали  $2,9\%$  для аденіну ( $(4,0 \pm 0,12) \times 10^{-5}$  моль/л),  $3,2\%$  для гіпоксантину ( $(4,0 \pm 0,13) \times 10^{-5}$  моль/л) та  $4,0\%$  для гуаніну ( $(4,0 \pm 0,16) \times 10^{-5}$  моль/л).



**Рис.3.4** Хроматограма стандартів пуринових основ



Час утримання і маса йона гіпоксантину (RT 4,450 хв, 137 m/z), гуаніну (RT 4,526 хв, 152 m/z) та аденіну (RT 8,542 хв, 136 m/z) (100 нг кожної азотистої основи в ін'єкції) та природного ізотопу аденіну (RT = 8,561, 137 m/z), отримана на колонці Zorbax C18.

Відтворюваність методу ВЕРХ/ЕРІ/МС перевіряли також в три різні дні протягом місяця, використовуючи ті ж концентрації аналітів, як і для перевірки відтворюваності показників впродовж одного дня. Отримані значення CV були вищими, ніж для тесту впродовж одного дня, зокрема: 4,5% для аденіну  $((4,0 \pm 0,18) \times 10^{-5}$  моль/л), 5,0% для гіпоксантину  $((4,0 \pm 0,20) \times 10^{-5}$  моль/л) і 6,0% для гуаніну  $((4,0 \pm 0,24) \times 10^{-5}$  моль/л). Вихід аналітів з біологічних зразків становив 96 - 98 % відповідно до виходу кофеїну як внутрішнього стандарту з варіабельністю виходу CV = 2,43%. Не було виявлено ефектів перенесення в деіонізованій воді після стандартів або біологічних зразків.

**3.6.2.2 Характеристики продуктивності методу ВЕРХ/ЕРІ/МС для кількісного визначення пуринів.** Для кількісного визначення пуринів були побудовані стандартні криві. Лінійність кривих досліджувалась шляхом обчислення лінійної регресії методом найменших квадратів. Через широкий діапазон інтервалів концентрації та зменшення чутливості МС із збільшенням кількості введеного аналіту ми отримали нелінійну відповідь МС на серійні розведення кожної окремої сполуки у найвищих концентраціях. Ми застосували часто використовувані для подібних кількісних оцінок МС поліноміальні функції другого порядку, які краще підходили до отриманих даних (173,174). Характеристики методу представлені в табл. 3.13.

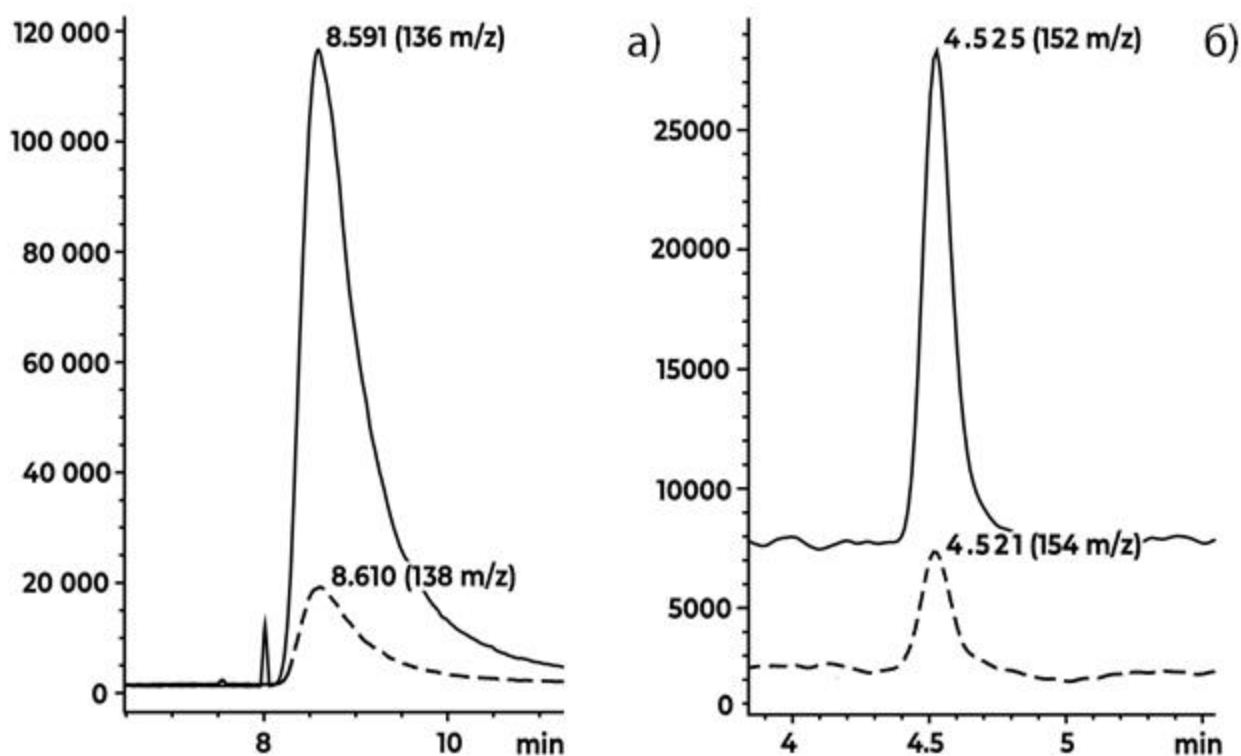
Таблиця 3.13.

Характеристики методу кількісного визначення пуринів (колонка Zorbax C18)

Стандарт	Рівняння	Коефіцієнт кореляції, R <sup>2</sup>	Діапазон відповіді (моль/л)	Ліміт детекції (моль/л)	Ліміт квантифікації (моль/л)
Аденін	$y = 3E-13 \cdot x^2 + 2E-06 \cdot x + 0.1195$	0,9998	$1 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-4}$	4,17412E-09	4,14417E-08
Гуанін	$y = 3E-11 \cdot x^2 + 2E-05 \cdot x - 0.075$	0,9987	$1 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-4}$	1,10036E-07	1,51897E-06
Гіпоксантин	$y = 4E-13 \cdot x^2 + 4E-06 \cdot x - 0.0072$	0,9992	$1 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-4}$	1,3633E-08	8,75646E-08

**Примітка:** у рівнянні калібрувальної кривої 'у' позначає кількість аналіту у введеному об'ємі, молі; х - площа піку

**3.6.3. Концентрація мічених та немічених пуринів у плацентарних експлантатах та клітинах MCF-7.** Хроматограми аденіну, гуаніну та гіпоксантину в обох типах біологічних зразків виявили такий же час утримування аналітів як у відповідних стандартів. Мас-детектор надійно розпізнав важкі (+2 m/z) аденін (138 m/z), гіпоксантин (139 m/z) та гуанін (154 m/z) і відповідні немічені основи з m/z 136, 137 та 152 m/z (рис. 3.5 і табл. 3.14).



**Рис. 3.5** Хроматограма гідролізатів експлантів плаценти.

Немічені (суцільні лінії) і мічені (пунктирними лініями) аденін а) та гуанін б) у експлантах, культивованих без гомоцистеїну.

Концентрація мічених і немічених пуринових основ в клітинах MCF-7 під впливом гомоцистеїну  
( $\mu\text{моль}/10^8$  клітин)

Нсу, $\mu\text{M}$	A	A**	Нур	Нур**	G	G**	Мічені пурини	Всі пурини	Мічені пурини/ Всі пурини, %%
0	4,33 $\pm 0,702$	3,44 $\pm 0,627$	0,15 $\pm 0,073$	0,30 $\pm 0,073$	3,06 $\pm 0,489$	4,26 $\pm 1,48$	7,91 $\pm 1,409$	14,69 $\pm 1,698$	55,41 $\pm 5,298$
20	3,21 $\pm 0,540$	2,25 $\pm 0,443$	0,111 $\pm 0,017$	0,17 $\pm 0,017$	1,91 $\pm 0,317$	1,54 $\pm 0,292$	3,91 $\pm 0,672$	9,89 $\pm 1,830$	38,51 $\pm 2,181$

**Примітка:** літери A, G та Нур позначають відповідно аденін, гуанін та гіпоксантин, а Нсу -гомоцистеїн. Основи, позначені подвійними зірочками, є [ $^{13}\text{C}2$ ] міченими. Під назвою “Всі пурини” розуміється сума мічених і немічених нуклеотидних основ. Статистичну значущість відмінностей між концентрацією пуринів у клітинах MCF-7, культивованих з гомоцистеїном і без нього, оцінювали за парним тестом Вілкоксона. Різниця між значеннями для клітин MCF-7, які культивувались 20  $\mu\text{M}$  Нсу та без нього, була статистично значущою відповідно до р-значень за тестом Вілкоксона.

Вплив гомоцистеїну на концентрацію мічених і немічених пуринових основ (μмоль /г тканини) в плацентарних експлантах з першого триместру вагітності

Нсу, μМ	A	A**	Нур	Нур**	G	G**	Мічені пурини	Всі пурини	Мічені пурини/ Всі пурини, %%
0	4.71 ± 0.283	0.05 ± 0.006	0.028 ± 0.001	n.d.	4,0 ± 0.32	0.04 ± 0.001	0.10 ± 0.006	8.8 ± 0.50	1.06 ± 0.132 <sup>γ</sup>
20	3.8 ± 0.27	0.03 ± 0.002*	0.021 ± 0.002	n.d.	2.8 ± 0.21	0.02 ± 0.004	0.05 ± 0.005	6.7 ± 0.47	0.75 ± 0.155 <sup>γ</sup> *
40	2.9 ± 0.14	0.02 ± 0.001*	0.018 ± 0.002	n.d.	1.5 ± 0.09	0.001 ± 0.0001	0.022 ± 0.001	4.4 ± 0.24	0.49 ± 0.008*

**Примітка:** літери A, G, і Нур означають аденін, гуанін і гіпоксантин. Нсу – гомоцистеїн. Основи, помічені двома зірочками у заголовку означають мічені основи. Під терміном “Всі пурини” розуміється сума мічених і немічених нуклеотидних основ. Мічений гіпоксантин був нижче порогового значення визначення (n.d.). Статистична значущість різниці значень при культивуванні з гомоцистеїном і без була в межах  $0,0002 < p < 0,0275$  за методом one-way ANOVA і *post hoc* Newman-Keuls тест.

## Концентрація пуринів в плацентарних експлантах з третього триместру

Пурини	Концентрація	Пурини	Концентрація
Аденін	2,72 ± 0,0708	Гуанін	1,09 ± 0,0189
Аденін **	0,02 ± 0,0014	Гуанін **	n,d,
Гіпоксантин	0,02 ± 0,0014	Мічені пуриниL	0,021 ± 0,0014
Гіпоксантин **	n,d,	Всі пурини	3,855 ± 0,0869

**Примітка.** Статистичну значимість різниці між даними визначали за допомогою Т-тесту Стьюдента. Значення р були в межах  $0,000002 < p < 0,002705$ .

Немічений аденін, гуанін та гіпоксантин мають свої природні ізотопи зі специфічними значеннями  $m/z$ . Для обчислення відносної кількості природних ізотопів  $M+2$  кожного аналізованого зразка ми використовували онлайн-інструмент «Калькулятор розподілу ізотопів та графік масових спектрів» (Scientific Instrument Services від Adaptas Solutions, Palmer, MA, США), доступний за посиланням (<https://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm>). Для аденіну, гуаніну та гіпоксантину співвідношення  $M + 2/M$  складають відповідно 0,233, 0,437 та 0,411%. Оскільки піки  $M + 2$  перекриваються з міченими  $[^{13}C_2]$  аналізованими основами, концентрації останніх розраховувались з урахуванням оцінених площ піків  $M + 2$  природних ізотопів. Кількісне визначення маркованих і не маркованих пуринів показало, що всі отримані значення були вище значення LOQ, за винятком міченого гіпоксантину та міченого гуаніну в декількох зразках. Щоб порівняти отримані результати з обох типів біологічних зразків, ми представили кількість пуринів у клітинах MCF-7 на  $10^8$  клітин, оскільки саме це значення доволно відповідає 1 г епітеліальної тканини (175).

Порівняння концентрації **немічених пуринів** у експлантатах плаценти та клітинах MCF-7, оброблених та не оброблених гомоцистеїном, виявило, що

їх вміст у всіх зразках був однакового порядку та у послідовному зменшенні їх кількості один до одного: аденін > гуанін > гіпоксантин. Незважаючи на аналогічну концентрацію немічених пуринів, фракції новосинтезованих пуринів у цих зразках були досить різними.

Об'єднана фракція всіх **мічених пуринів** була більш ніж на порядок меншою в експлантатах плаценти, порівняно з клітинами MCF-7, тоді як концентрація загальних пуринів (мічених та немічених) була майже в два рази меншою. Частка об'єднаних мічених пуринів у загальних пуринах становила близько одного відсотка у необроблених гомоцистеїном експлантатах плаценти першого триместру порівняно з відповідним значенням 50% у клітинах MCF-7. Найнижчі значення концентрації загальних пуринів та об'єднаної фракції новосинтезованих пуринів були в експлантатах плаценти з третього триместру гестації, а в тих, які культивувались при 40  $\mu\text{M}$  гомоцистеїну, мічені гуанін та гіпоксантин були нижче порогового рівня виявлення (табл. 3.17).

Таблиця 3.17

Вміст об'єднаних фракцій пуринів в експлантах та клітинах MCF-7

Hcy, $\mu\text{M}$	Плацентарні експланти				MCF-7 клітини	
	I триместр		III триместр		Мічені пурини	Всі пурини
	Мічені пурини	Всі пурини	Мічені пурини	Всі пурини		
0	0.10 $\pm 0.006$	8.8 $\pm 0.50$	0,021 $\pm 0,0014$	3,855 $\pm 0,0869$	7,91 $\pm 1,409$	14,69 $\pm 1,698$
20	0.05 $\pm 0.005$	6.7 $\pm 0.47$	-	-	3,91 $\pm 0,672$	9,89 $\pm 1,830$
40	0.022 $\pm 0.001$	4.4 $\pm 0.24$	-	-	-	-

Культивування обох типів біологічних зразків з 20  $\mu\text{M}$  гомоцистеїну

виявило зниження концентрації загальних та новосинтезованих пуринів. Відносний вплив 40  $\mu\text{M}$  гомоцистеїну виявив майже таку ж тенденцію в плацентарних експлантатах та клітинах MCF-7, що й 20  $\mu\text{M}$  гомоцистеїну, а саме: знижував частку новосинтезованих пуринів до  $\sim 70\%$  ( $0,75 * 100 / 1,06$ ) в експлантах та до  $\sim 75\%$  ( $38,51 * 100 / 55,41$ ) у клітинах MCF-7 порівняно з базовою лінією (стандартними умовами). Ефект гомоцистеїну 40  $\mu\text{M}$  був більш різким в експлантатах першого триместру та виявив залежність від концентрації гомоцистеїну.

**Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:**

R. Rodriguez, I. Konovets, S. Ralchenko, M. Kharkhota, A. Kostyuk, V. Kosach, I. Voronina, N. Filimonova, M. Obolenskaya. A low-cost mass spectrometry-based approach for quantifying purines in placental explants. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2021; 460: 116490.



## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Фолат-залежний метаболізм - це базовий процес клітинного метаболізму, тісно пов'язаний з синтезом попередників нуклеїнових кислот, енергоносіїв і сигнальних молекул, процесами метилювання, і опосередковано із синтезом глутатіону, який відіграє провідну роль у підтриманні окисно-відновного стану клітини. Таким чином фолат-залежний метаболізм задіяний у забезпеченні трьох першочергових потреб для поділу і диференціації клітин - синтезі макромолекул, забезпеченні енергією й підтримці окисно-відновного потенціалу (176). Саме тому фолат-залежний метаболізм є особливо важливим для плаценти, органу, який росте і диференціюється. При виникненні патологічних процесів численні внутрішні і зовнішні фактори призводять зрештою до пошкодження базових метаболічних процесів як через зміни в передачі генетичної інформації, так і на рівні посттрансляційної регуляції ензимів. Фолат-залежні процеси в плаценті людини мало досліджені через цілком зрозумілі причини, а просте перенесення даних від інших організмів і органів, зокрема, від печінки, де він найкраще вивчений, неможливий через виняткову органо- і тканинспецифічність плаценти. Через особливості органу і складність і розгалуженість метаболічних процесів їх дослідження виявляється надскладною задачею.

На допомогу в наш час приходять методи моделювання, які дозволяють передбачити наслідки тих чи інших змін і цілеспрямовано й вибірково перевірити їх експериментально.

Наразі опубліковано кілька моделей фолат-залежного метаболізму різного рівня складності: досить детальна кінетична модель, адаптована для печінки, спрощена кінетична модель фолатного циклу, гібридна стохастично-кінетична модель фолатного і метіонінового циклів, кінетична модель фолатного метаболізму дії метотрексату (177–180). Через відсутність

кінетичних даних ми зупинилися на стехіометричній моделі, оскільки вона є найбільш вдалим компромісом між кількістю необхідних початкових даних для моделювання і прогностичним потенціалом моделі.

#### **4.1. In silico і ex vivo моделі для дослідження фолат-залежного метаболізму**

Ми вперше побудували стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини, враховуючи тканинспецифічність органу. Ми застосували модель для аналізу поведінки метаболічної мережі при навантаженні гомоцистеїном, що симулює гіпергомоцистеїнемію помірної і середньої тяжкості, і також за найпоширенішою серед європейської раси мутацією в ензимі метилентетрагідрофолатредуктази. Отримані біоінформатичні дані перевірено в експерименті і проаналізовано із залученням сучасних знань в цій галузі.

В якості експериментальної моделі для аналізу впливу гіпергомоцистеїнемії на фолат-залежні процеси в плаценті людини ми обрали плацентарні експланти. Такий підхід дозволив оцінити вплив гомоцистеїну, який додавали в середовище, одночасно на всі типи клітин плаценти у їх природному взаємозв'язку і структурі. Відомо, що гомоцистеїн транспортується через мікроворсинчасту плазматичну мембрану плаценти і впливає на метаболізм і функції плаценти (4,181,182). Для експериментів із визначення впливу гомоцистеїну на синтез S-аденозилметіоніну і S-аденозилгомоцистеїну ми обрали експланти зрілої плаценти з огляду доступності тканини для дослідів і, зважаючи, що у зрілій плаценті процеси метилювання досить активні, а отже і реакції метіонінового циклу (27,71,183). Натомість для оцінки синтезу пуринів *de novo* ми культивували експланти з плаценти першого триместру вагітності, де за даними Марценюк та ін. (71) проліферативна активність найвища на відміну від майже відсутньої проліферації в плаценті наприкінці третього триместру.

## **4.2. Характеристика системи фолат–залежного метаболізму в плаценті людини за умов фізіологічного перебігу вагітності і носійства дикого типу гена *MTHFR***

**4.2.1. Розподіл метаболічних потоків в плаценті людини за фізіологічних умов.** Модель фолат-залежного метаболізму надала змогу оцінити баланс потоків, тобто питому вагу кожної реакції (або метаболічного шляху) у загальній метаболічній системі за носійства дикого типу гена *MTHFR*. Аналіз моделі засвідчив, що найбільша питома вага належить імпорту серину, за ним у спадній послідовності розташовуються групи реакцій з однаковою питоною вагою в кожній – реакції метіонінового циклу, окрім метіонінсинтази, рівень якої компенсується постачанням метіоніну ззовні; реакції синтезу глутатіону і пов'язані з ним реакції постачання глутаміну та виходу глутатіону; реакції транссульфування; потік через серингідроксиметилтрансферазу (SHMT); і приблизно на однаковому рівні реакції фолатного циклу і синтезу пуринів (Рис. 3.2). Серин використовується в реакції утворення метилентетрагідрофолату і на перших етапах реакції транссульфування. Модель підтверджує важливість серину як головного постачальника одновуглецевих груп для фолатного циклу, що активно обговорюється в літературі (15). Знижену активність SHMT розглядають як одну із причин незрощення нервової трубки у плода (6).

Аналіз балансу потоків дав змогу оцінити, яким з конкуруючих потоків надається перевага при утилізації гомоцистеїну. Наприклад, за початкових умов потік транссульфування у 2,5 рази більший за потік реметилювання (CBS і CTGL проти MS) (Рис.3.1) і є превалюючим шляхом утилізації гомоцистеїну. Однак, на підставі дослідження інших тканин, вважається, що обидва процеси рівнозначні за своїм вкладом в утилізацію гомоцистеїну (51). Результати дослідження плазми вагітних уточнюють, що швидкість транссульфування вища на ранніх етапах гестації, знижується на третьому триместрі і досягає рівня, характерного для невагітних жінок, Швидкість метилювання, навпаки, 123

була вищою в третьому триместрі (8).

**4.2.2. Експресія генів фолат-залежного метаболізму і кінцеві продукти їх активності в плаценті першого триместру і наприкінці вагітності.** Для кращого розуміння змін в плацентарному фолат-залежному метаболізмі протягом гестації ми дослідили у першому триместрі і наприкінці неускладненої вагітності експресію генів, які відповідають за синтез пуринів, тимідинмонофосфату (*GARS*, *GARS-AIRS-GART*, *ATIC* і *TYMS*), метіоніну (*MS*) і лімітуючого ензиму синтезу глутатіону (*GLC*) та реакцій транссульфування (*CBS* і *CDO*). Отримані дані ми доповнили вперше визначеними значеннями концентрацій SAM і SAH і загальних та *de novo* утворених пуринів. В цілому рівень експресії перелічених генів знижується наприкінці вагітності в порівнянні з першим триместром. Особливості в експресії спостерігаються для гена *GARS-AIRS-GART*, який відповідає за другу, третю і п'яту стадії 10-стадійного синтезу пуринів *de novo*, гена *TYMS* і гена *CDO*, який кодує діоксигеназу.

**4.2.3. Синтез пуринів в плаценті людини.** Досліджуючи синтез пуринів, ми вперше в цій роботі виявили, що в плаценті людини поряд з трифункціональним транскриптом і білком, які відповідають за другу, третю і п'яту стадії синтезу пуринів, існує окремий короткий транскрипт і окремий білок *GARS* (184), які за своєю структурою мали б відповідати за другу стадію синтезу пуринів, але функція їх невідома. В першому триместрі концентрація коротких мРНК і білка більша за концентрацію повнорозмірних мРНК і білка, але знижується разом з повно-розмірною формою наприкінці вагітності і дорівнює концентрації останній (таблиця 3.7). Короткі *GARS* мРНК і білок були виявлені в печінці людини і птахів, в Т-клітинах миші і у дрозофіли (185–187). Обидві ізоформи наявні в мозочку людини впродовж перинатального періоду, але вони зникають незабаром після народження (159). Роль коротких *GARS* ще не встановлена. Відомо, що продукт першої реакції синтезу пуринів,

перетворення 5-форсфорибозилпірофосфату (PRPP) в 5-фосфо-D-рибозозиламін (PRA), який є субстратом для GARS, є нестійким (188–190). Ми припускаємо, що підвищена концентрація короткої ізоформи, не зв'язаної з пуриносомою, сприяє швидкому перетворюванню продукту першої реакції в більш стабільний гліцинамід рибонуклеотид саме в першому триместрі, коли відбуваються інтенсивні синтетичні процеси. Істотне зниження в третьому триместрі вмісту мРНК *GARS*, *GARS-AIRS-GART* та *ATIC*, остання кодує завершальну реакцію 10-стадійного синтезу пуринів, зумовлює зниження синтезу пуринів *de novo*, що було показано в цій роботі (159).

Існуючі дані щодо інтенсивності синтезу пуринів в тканинах евкаріот вкрай обмежені. Частіше вони отримані різними методами, відображають синтез окремих фракцій пуринів і їх похідних, наводяться в різних одиницях і не піддаються порівнянню. Ми вперше визначили тотальний вміст пуринів та інтенсивність їх синтезу *de novo* в експлантах плаценти першого і третього триместру і для порівняння в клітинах MCF-7. Виявили значно меншу інтенсивність синтезу в експлантах в порівнянні з клітинами MCF-7, Це пояснюється тим, що клітини MCF-7 після періоду адаптації приблизно впродовж 48 годин після початку культивування ростуть експоненціально протягом 4 - 5 днів із середнім подвоєнням кількості клітин за 24 год до утворення моношару (191). Ситуація в експлантатах плаценти суттєво відрізняється через структуру експлантів, які містять моношар цитотрофобласту, клітини якого активно діляться і згодом диференціюються у синцитіотрофобласт, шар клітин, які не діляться, і позаворсинковий цитотрофобласт, клітини якого продовжують ділитися і проникають у децидуальну оболонку, в її кровеносні і лімфатичні судини і в залози децидуальної оболонки (192). Таким чином, частка проліферуючих клітин у плацентарних експлантах значно менша, ніж в клітинах MCF-7, 100 % яких діляться, що і пояснює отриману між ними різницю. В третьому триместрі активність синтезу пуринів *de novo* настільки мала, що вона майже не

визначається в плацентарних експлантах.

*Знижена експресія генів, які відповідають за синтез пуринів, і мізерно мале новоутворення пуринів в третьому триместрі значною мірою зумовлюють знижену проліферативну активність в плаценті, виявлену в попередніх роботах нашої лабораторії і в роботах інших авторів (71,193).*

**4.2.4. Потенціал метилювання в плаценті.** Найбільш розповсюдженим і визнаним маркером порушень у фолат-залежному метаболізмі вважається рівень гомоцистеїну в крові, який визначають численні клінічні лабораторії. Наукові публікації засвідчують, що гіпергомоцистеїнемія вагітних асоціюється з преєклампсією, гіпертонією тощо. В останні роки проміжні метаболіти метіонінового циклу SAM і SAH стали вважати більш надійними показниками порушень фолат-залежного метаболізму, а співвідношення SAM/SAH - показником активності метилювання. Його зниження пов'язують з порушеннями в серцево-судинній системі, дисфункцією нирок тощо.

В цій роботі ми вперше охарактеризували вміст SAM і SAH в плаценті людини. За нашими експериментальними даними концентрація SAM в плаценті людини становить 8,33-18,73 нмоль/г тканини, яка від шести до шістнадцяти разів менша, ніж у широко вивченому об'єкті метаболічних досліджень — печінці щурів (60,0 - 160,0 нмоль/г тканини) і менша, ніж найменша концентрація в тканинах щура (близько 21,5 нмоль/г тканини). Концентрація SAM в плаценті людини перевищує концентрацію SAH. Остання (5,20 - 8,74 нмоль/г тканини) від двох до семи разів менша, ніж у печінці, нирках і надниркових залозах щурів, але порівнянна з концентрацією в інших органах щурів (194,195). Співвідношення SAM/SAH в плаценті людини (1,86 - 2,64) близьке такому співвідношенню в печінці щурів (~ 1,4) і набагато менше, ніж в інших тканинах щурів (наприклад, у серці і тонкому кишечнику SAM/SAH - 10/1) (170). Згідно нашої інформації, це перше визначення концентрації SAM і SAH і їх співвідношення в тканині людини.

Ми припускаємо, що різниця в абсолютному вмісті SAM і SAH між плацентою людини й існуючими даними в тканих щурів пов'язана з більш інтенсивним обміном речовин в тканинах гризунів (196).

Як показано в нашій роботі, експресія гена *MS*, який кодує метіонінсинтазу і забезпечує синтез метіоніну – субстрату для метіонін аденозилтрансферази (MATII), знижується протягом гестації, що може призводити до зменшення вмісту SAM, який забезпечує реакції метилювання (197). Вельми вигодне зменшення концентрації SAM в кінці вагітності невідворотно призведе не тільки до зменшення реакцій метилювання, але й до зниження синтезу спермідину і сперміну, для яких SAM є донором *n*-пропіламіну (197). Дійсно, є повідомлення про знижений синтез поліамінів (спермідину і сперміну) в плаценті наприкінці вагітності, а ці речовини в першу чергу необхідні для підтримки проліферації (113). Численні реакції метилювання в плаценті людини вивчені дуже мало, хоча їх принципова роль у функціонуванні органу не викликає сумнівів. Метилювання ДНК в плаценті відображає до певної міри стан середовища всередині матки і розглядається як певний його маркер. Метилювання ДНК в плаценті відіграє критичну функціональну роль у розвитку плоду, а також впливає на життя дитини в постнатальному періоді і заслуговує на ретельне дослідження (99,198,199).

**4.2.5. Транссульфування і регуляція вмісту цистеїну в плаценті.** За експериментальними даними, більшість з яких було отримано в нашій лабораторії, стало відомо, що гени *CBS*, *CDO* і *CTGL* експресуються в плаценті на рівні мРНК і білків і навіть вперше була доведена ензиматична активність цистітійонін- $\beta$ -синтази (CBS) (4,71,120). Таким чином система транссульфування активно працює в плаценті людини, хоча менш активно, ніж в печінці людини (4). Раніше вважалося, що в цистітійонін- $\beta$ -синтаза функціонує лише в печінці, підшлунковій залозі, нирках і рогівці ока (7).

Цистітійонін- $\beta$ -синтаза (CBS) разом з цистатіонін- $\gamma$ -ліазою (CTGL) каталізує утворення цистеїну з гомоцистеїну. Через здатність цистеїну до

самоокислення і, відповідно, через його цитотоксичність, клітини утилізують цистеїн. Як коротко описано у попередніх розділах, основні шляхи утилізації цистеїну — це конвертація його в таурин, перетворення на піруват і сульфінат через активацію трансамінації і спрямування його в «сховище» - глутатіон, звідки в разі потреби його можна вилучити через послідовні реакції глутатіон → цистеїнілглутатин → цистеїн (200). Таурин і глутатіон не є цитотоксичними. Згідно результатів моделювання, перевага в клітині віддається синтезу глутатіону перед синтезом таурину. І це відповідає співвідношенню мРНК відповідних ензим-кодуєчих генів у першому триместрі вагітності. Втім у зрілій плаценті ситуація з рівнем обох мРНК змінюється.

Багатократне збільшення рівня мРНК *CDO* наприкінці вагітності, яке суттєво відрізняє експресію цього гена від досліджених нами інших генів, свідчить про значну активацію експресії гена. Ми припустили, що перехід від гістотрофного в першому триместрі до гемотрофного живлення у другому та третьому триместрах супроводжується більшим надходженням цистеїну до плаценти та активацією експресії *CDO* за участі ще невідомого механізму регуляції експресії гена (113,201–203).

Перехід від анаеробного метаболізму в першому триместрі до аеробного у другому та третьому триместрах ставить певні вимоги до антиоксидантної системи плаценти, оскільки перехід спричиняє окислювальний стрес. Статистично незначне зменшення кількості копій мРНК, які кодуєть лімітуючий ензим синтезу глутатіону, глутатіонцистеїнлігазу (*GCL*), не повинно впливати на досить високий рівень синтезу глутатіону.

Наведені дані щодо змін експресії генів впродовж періоду гестації ще раз засвідчили, що при створенні моделей та дизайні експериментів слід враховувати не тільки тканиноспецифічні особливості метаболізму й експресії генів, а й зміни впродовж гестації.



### **4.3 Фолат–залежний метаболізм в плаценті людини при гіпергомоцистеїнемії**

Гіпергомоцистеїнемія, особливо її помірні і середні форми (15 - 30  $\mu\text{моль/л}$ ), характерна для багатьох патологій людини і, зокрема, для ускладнень вагітності, наприклад, широко поширеної в світі прееклампсії (89,204,205). В першу декаду ХХІ ст. було показано, що гомоцистеїн транспортується через плазматичну мембрану і впливає на плацентарний метаболізм (79).

Моделювання гіпергомоцистеїнемії через навмисне збільшення в два рази потоку через реакцію S-аденозилгомоцистеїн гідролазу (SAHH) показало зниження питомої ваги реакцій фолатного циклу і синтезу пуринів і підвищення потоків через метилентетрагідрофолатредуктазу, метіоніновий цикл і транссульфування.

Експериментальні дані, отримані в цій роботі, засвідчили, що інтенсивність новоутворення пуринів знижується при культивуванні плацентарних експлантів з 20  $\mu\text{М}$  гомоцистеїном, а вміст SAM і SAH підвищується і при цьому не змінюється співвідношення SAM/SAH.

#### **4.3.1 Метилювання і транссульфування під впливом гомоцистеїну.**

Ми припускаємо, що підвищення концентрації SAM пов'язано з «необхідністю» утилізувати додаткову кількість гомоцистеїну, а це можливо через метилювання і транссульфування. Кінетичні характеристики метіонінсинтази ( $K_m$ ) для L-гомоцистеїну дорівнюють 0,0026–0,430 мМ і для 5-метилтетрагідрофолату 0,013–0,073 мМ [<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.1.1.13>]. За нашими попередніми даними концентрація 5-метилтетрагідрофолату в плаценті складає  $\sim 0,02$  мМ (4), тобто метіонінсинтаза може використовувати 20  $\mu\text{М}$  гомоцистеїн для утворення метіоніну. Наступний ензим метіонінаденозинтрансфераза 2А (MAT2A) з  $K_m$  для метіоніну в межах 60–100  $\mu\text{М}$  і для АТФ біля 0,002 мМ (<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.5.1.6&UniProtAcc=Q9NZL9&> Organism-

mID=%d) може забезпечити утворення SAM, використовуючи 115 мкМ метіонін DMEM-F12 середовища, і близько 8 μМ АТР в плаценті згідно даних цієї роботи (209). Таким чином за законом діючих мас ензими MS і MAT2A можуть забезпечити і скорше забезпечують збільшену продукцію SAM і SAH.

Першочергові зміни, спричинені гомоцистеїном в метіоніновому циклі й у транссульфуванні, мають свої більш далекоглядні наслідки. Концентрації SAM і SAH, пов'язані між собою численними реакціями метилювання, для яких SAM є універсальним донором метильної групи, а SAH є універсальним продуктом реакцій разом з метильованими продуктами. Кожна метилтрансфераза має характерні для неї константи – значення  $K_m$  для SAM й  $K_i$  значення для SAH, і таким чином, специфічно залежить від концентрації SAM і SAH та їх співвідношення. Оскільки SAH є конкуруючим із SAM інгібітором метилтрансферази, то рівняння Міхаеліса – Ментен набуває вигляду

$$\begin{aligned} \text{Частка максимальної каталітичної швидкості} &= \\ &= [SAM]/(K_m + K_m[SAH]/K_i + [SAM]), \end{aligned}$$

де [SAM] і [SAH] - концентрації метаболітів (206).

В якості прикладу ми обрали дві метилтрансферази – DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A, EC 2.1.1.37) і катехол-О-метилтрансферазу (COMT, EC 2.1.1.6) для того, щоб продемонструвати як може змінюватися каталітична швидкість реакції в трьох ситуаціях – в інтактній плацентарній тканині й в експлантах, культивованих з і без гомоцистеїну. Ензим DNMT3A необхідний для *de novo* метилювання ДНК і важливий для створення відповідного типу метилювання в процесі розвитку (207,208). Аберантна DNMT3A критична для розвитку прееклампсії (209,210). COMT каталізує О-метилювання катехолових естрогенів таких, як 2- і 4-гідроксіестрадіол (2-ОН-Е2 і 4-ОН-Е2), які є мажорними продуктами окислення 17 $\beta$ -естрадіолу й

естрону в плаценті людини (211). Знижена активність COMT асоціюється з пре-еклампсією (212). Кінетичні константи DNMT3A (207,208) і розчинної форми COMT, S-COMT (213), наведені в таблиці 4.1 разом із часткою максимальної каталітичної активності обох ензимів в плаценті й плацентарних експлантах.

На прикладі каталітичної швидкості двох метилтрансфераз, DNMT3A й S-COMT, ми показали, що концентрації гомоцистеїну, які спостерігаються в клініці, по-різному впливають на активність метилтрансфераз залежно від індивідуальних кінетичних характеристик метилтрансфераз, і, скоріше за все, зумовлюють широкий спектр змін, враховуючи чисельність і функціональні особливості метилтрансфераз.

*Таблиця 4.1*

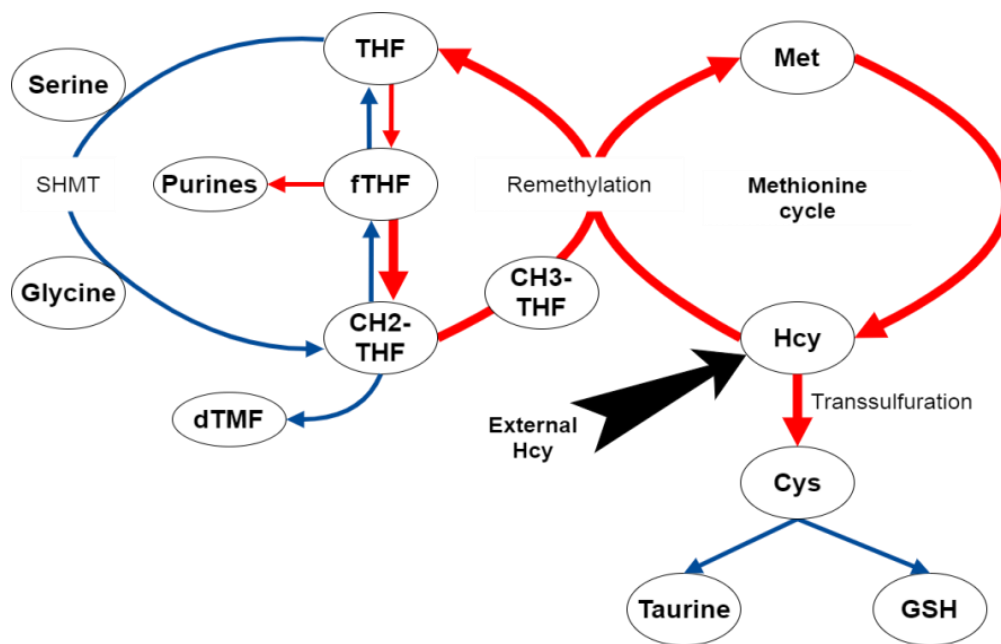
Частка максимальної кінетичної активності ензимів DNMT3A і S-COMT за різного потенціалу метилювання

Ензим	SAM Km (μM)	SAH Ki (μM)	Частка максимальної активності ензимів в абсолютних (μM/хв.) і (відносних) одиницях		
			Тканина плаценти	Плацентарні експланти	
				контроль	20 μM Hcy
DNMT3A	0,25	0,163	0,53 (1,0)	0,82 (1,54)	0,84 (1,58)
S-COMT	113,0	6,7	0,045 (1,0)	0,06 (1,3)	0,10 (2,3)

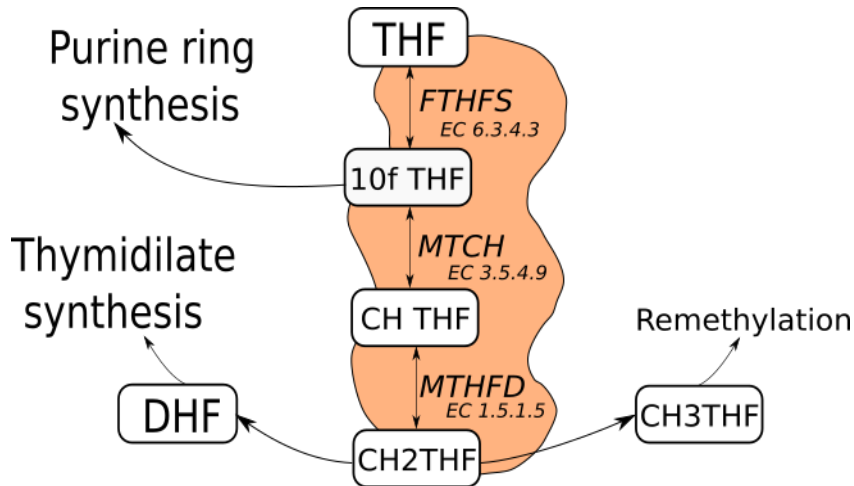
Примітка. Вміст SAM і SAH, нмоль/г, в тканині плаценти (9,99 і 5,57) і в плацентарних експлантах, контроль (8,44 і 1,07) і в присутності 20 μM Hcy (16,3 і 1,8).

**4.3.2 Синтез пуринів під впливом гомоцистеїну.** Для активації метилювання в присутності гомоцистеїну донором метильної групи є метилтетрагідрофолат, який утворюється з метилентетрагідрофолату шляхом відновлення ензимом метилтетрагідрофолат редуктаза MTHFR. Відомо, що

метилентетрагідрофолат постачає одновуглецеві групи одразу для трьох метаболічних шляхів (рис.4.2) – для реметилування (ензимами MTHFR і MS), для синтезу тимідилату (ензим TS) і для синтезу формілтетрагідрофолату (ензимами MTD, MTSN), який, у свою чергу, використовується в синтезі пуринових нуклеотидів (ензимами PGT та AICART). Тому, якщо активність одного з цих трьох конкуруючих за метилентетрагідрофолат шляхів зменшується, активність інших зростає за умови достатньої кількості інших необхідних субстратів. Це скоріше за все і відбувається за умов гіпергомоцистеїнемії (Рис.4.1).



**Рис.4.1** Фолатний та метіоніновий цикли та процес транссульфування за умов гіпергомоцистеїнемії. Потовщені червоні лінії позначають переважаючі потоки метаболізму



**Рис.4.2** Метилентетрагідрофолат(CH<sub>2</sub>ТНФ) у трьох конкуруючих метаболічних шляхах.

Зниження концентрації загальних і новоутворених пуринів ми спостерігали в плацентарних експлантах культивованих з гомоцистеїном. Ці дані узгоджуються з даними стехіометричної моделі, яка передбачає 30% зменшення метаболічного потоку через реакції біосинтезу пуринів. Більше того, це співпадає зі зменшенням експресії фактору проліферації Кі67 в експлантатах плаценти за таких же умов (71). Отже, зниження синтезу пуринів має істотний внесок у загальне зниження активності проліферації у відповідь на підвищений рівень гомоцистеїну, що імітує легку та помірну гіпергомоцистенемію.

Зниження в синтезі пуринів під впливом гомоцистеїну спостерігалися як в плацентарних експлантах, так і в клітинах MCF-7. За своїм характером і через знижену проліферативну активність вони нагадують реакцію ендотеліальних клітин судин, гепатоцитів і нейронів під впливом гіпергомоцистеїнемії (214) і принципово відрізняються від посиленої проліферації клітин гладеньких м'язів за тих же умов (215). Додаткові дослідження необхідні для з'ясування механізму тканинспецифічного впливу гомоцистеїну щодо біосинтезу пуринів.

Якщо зміни, які передбачає модель, зумовлені законом діючих мас, то

до змін, які спостерігаються в експерименті, можуть бути причетні також інші процеси. Гіпергомоцистеїнемія в плаценті людини часто пов'язана з дефіцитом фолатів через негативну кореляцію між ними (4). Як було показано нещодавно, концентрація фолатів позитивно корелює з активністю комплексу mTOR, потужного регулятора анаболічних процесів і синтезу пуринів, зокрема. Низька концентрація фолатів супроводжується зниженим синтезом пуринів в клітинах трофобласта людини (46). Достеменний механізм цієї дії наразі невідомий.

Здатність гомоцистеїну впливати на активність метилтрансфераз, зв'язуватися з білками і пептидами і змінювати їх активність, підвищувати продукцію реактивних сполук кисню і оксиду азоту, перетворюватися в тіолактон та вбудовуватися в білки, викликати стрес ендоплазматичного ретикулуму, змінювати метаболізм і транспорт ліпідів, регуляцію сигнальних шляхів, опосередковано впливати на концентрацію сірководню, який є одним із кінцевих продуктів процесу транссульфування суттєво розширює його вплив на функціонування клітин (214,216). Молекулярні механізми цих ефектів здебільшого невідомі. Гомоцистеїн може проявляти свою дію завдяки специфічній (біо)хімічній реактивності. S-гомоцистеїнілування білків та тіолів низької молекулярної маси та N-гомоцистеїнілування білків, пряма взаємодія з оксидом азоту (88,217) - всі ці властивості гомоцистеїну безмежно розширюють спектр його мішеней, а відтак і його вплив на фенотип клітини.

**4.3.3 Передбачення змін у фолат-залежному метаболізмі за інших варіантів симуляції.** При моделюванні гетерозиготного носійства C677T метилентетрагідрофолат редуктази ми спостерігали до значної міри ефект протилежний тому, який викликає гомоцистеїн, і це зрозуміло. Адже за умов зниженої активності MTHFR, метилентетрагідрофолат опиняється в пастці і активно використовується для потреб фолатного циклу і синтезу пуринів та, навпаки, не надходить в необхідній кількості до процесів метилювання. Зростання інтенсивності синтезу попередників нуклеїнових кислот за

зниженої активності *MTHFR* обговорюється в літературі, хоча експериментально це поки не перевірено (218).

Глобальне гіпометилування в асоціації з носійством мутації С677Т гена *MTHFR* підтверджено роботами різних авторів (219–221). Схожі результати було отримано Ульріх з колегами (222) на кінетичній моделі одновуглецевого метаболізму в печінці людини. Кінетичні моделі складніші за стехіометричні, проте моделювання зниженої активності *MTHFR* так само показало зростання синтезу пуринів і піримідинів й зниження швидкості реакцій метилування ДНК.

Порівнюючи діапазони коливань значень потоків через різні реакції, можемо дійти висновку, що найменших змін за застосованих умов симулювання зазнають потоки в реакціях утворення таурину і глутатіону, а найбільших – потоки в реакціях утворення S-аденозилметіоніну і S-аденозилгомоцистеїну, що позначається на реакціях метилування. На зміни чутливо реагує транспорт гліцину. Значно змінюються, залежно від умов, потоки через реакції *MTD* і *MTCH*, котрі пов'язані з 10-формілтетрагідрофолатом, необхідним для синтезу пуринових основ *de novo*, а також з метилентетрагідрофолатом - критичним метаболітом для реметилування гомоцистеїну в метіонін. Потоки через реакції утворення пуринових мононуклеотидів і дезокситимідилату коливаються в межах 30% від початкових даних.

#### **4.4 Варіативність показників між різними зразками плаценти**

Ми спостерігали варіативність показників при визначенні SAM і SAH та пуринів в зразках плаценти від різних осіб і у відповідь на культивування з гомоцистеїном. Ми припускаємо, що це є проявом індивідуальних генетичних особливостей кожного зразка. Відомо, що гени, які кодують ензими реакцій фолат-залежного метаболізму, високополіморфні, наприклад, *MTHFR* має

6375 відомих поліморфізмів, метіонінсинтаза – 26150 і т.д. (38). Деякі з цих поліморфізмів впливають на активність відповідних метаболічних ланок, що і зумовлює різну відповідь на один і той же фактор. Одержані нами результати свідчать про істотну різницю в поведінці різних ланок системи за обраних умов її функціонування. На наш погляд, причиною нечітких і не завжди статистично вірогідних результатів, навіть у разі проведення широкомасштабних досліджень, є те, що не враховуються одночасно поліморфізм генів, забезпеченість амінокислотами, фолатами й іншими, задіяними у фолат-залежному одноуглецевому метаболізмі (223). У прийдешній час доступного секвенування стає все більш поширеним індивідуальний скринінг поліморфізму генів. Розробка моделі, яка може врахувати зміни в активності кожної реакції, дозволяє ефективно використовувати дані про наявний поліморфізм і легко модифікувати модель під особливості конкретного організму, що, в свою чергу, дає змогу оцінити індивідуальні особливості метаболізму, його чутливість до різних факторів. Таким чином метаболічні моделі обіцяють бути цінним інструментом у персоналізованій медицині.



## ВИСНОВКИ

Вперше проаналізовано фолат-залежний метаболізм в плаценті людини шляхом: характеристики експресії генів; створення стехіометричної моделі і визначення впливу помірної гіпергомоцистеїнемії і поліморфізму гена метилентетрагідофолатредуктази на параметри моделі. Передбачення моделі щодо впливу гомоцистеїну на реакції метіонінового циклу і синтез пуринів *de novo* перевірені в експерименті і підтверджені.

1. В плаценті людини з першого і третього триместрів гестації вперше показано, що гени, які кодують ензими синтезу пуринів, реметилування гомоцистеїну і цистатіонін- $\beta$ -синтазу, експресуються на обох строах гестації, в третьому триместрі менш інтенсивно, ніж в першому.

2. Вперше в зразках з першого і третього триместрів виявлено одночасну присутність повнорозмірних мРНК і білка трифункціонального гена GART і його укороченої форми, яка структурно відповідає монофункціональній формі. Функція укороченої форми потребує з'ясування.

3. Вперше створено і проаналізовано стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини на основі реакцій, які відбуваються в цитоплазмі

4. За даними моделі виявлено сім ключових метаболітів (THF, CH<sub>2</sub>THF, CHOTHF, Met, Hcy, Ser і Cys) і 23 елементарних моди (мінімально можливі комбінації реакцій для стаціонарного стану системи).

5. Згідно моделі постачання серину відіграє найважливішу роль у підтриманні системи фолат-залежного метаболізму в стаціонарному стані; транссульфування утилізує більшу частину гомоцистеїну, ніж реметилування; перевага в плаценті віддається синтезу глутатіону перед синтезом таурину, що корелює з співвідношенням мРНК відповідних ензим-кодуючих генів у першому триместрі вагітності

6. Вперше показано *in silico*, що моделювання помірної гіпергомоцистеїнемії призводить до зсуву метаболічних потоків в бік реакцій метіонінового циклу і транссульфування за рахунок реакцій фолатного циклу і синтезу пуринових основ *de novo*, зокрема.

7. Моделювання C677T генотипу метилентетрагідрофолатредуктази призводить до незначного зниження метаболічних потоків, які йдуть на реакції метіонінового циклу, і підвищення тих, які йдуть на процеси синтезу пуринів.

8. Вперше в плаценті людини визначено концентрацію S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну і їх співвідношення, відоме як «індекс метилювання».

9. В плаценті людини вперше визначено концентрацію пуринів і інтенсивність їх синтезу *de novo*.

10. Передбачення на основі моделі помірної гіпергомоцистеїнемії щодо перерозподілу метаболічних потоків підтверджені в експерименті підвищеним синтезом SAM і SAH і зниженим синтезом пуринів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Heazell AEP, Brown M, Worton SA, Dunn WB. Review: The effects of oxygen on normal and pre-eclamptic placental tissue--insights from metabolomics. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S119–24.
2. Chaiworapongsa T, Chaemsaitong P, Yeo L, Romero R. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Aug;10(8):466–80.
3. Myatt L. Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*. 2002 Oct;19(1):103–11.
4. Mislanova C, Martsenyuk O, Huppertz B, Obolenskaya M. Placental markers of folate-related metabolism in preeclampsia. *Reproduction*. 2011 Jun 21;142(3):467–76.
5. Stover PJ. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies. *J Nutr*. 2009 Dec;139(12):2402–5.
6. Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm*. 2008 Jan;79(08):1–44.
7. Chen NC, Yang F, Capecci LM, Gu Z, Schafer AI, Durante W, et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *FASEB J*. 2010 Aug 1;24(8):2804–17.
8. Dasarathy J, Gruca LL, Bennett C, Parimi PS, Duenas C, Marczewski S, et al. Methionine metabolism in human pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2010 Feb 1;91(2):357–65.
9. Banerjee R, Zou C. Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine- $\beta$ -synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch Biochem Biophys*. 2005 Jan 1;433(1):144–56.
10. Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis*. 2011 Feb;34(1):17–32.
11. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab*.;25(1):27-42. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.009.
12. Obolenskaya MY, Rodrigues RR, Martsenyuk OP. Folate-related processes in human placenta: Gene expression, aminothiols, proliferation and apoptosis. Vol. 83, 139

Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal. 2011. p. 5–17.

13. Martseniuk OP, Romanets' KL, Obolens'ka MI, Huppertz B. Effect of homocysteine on the structure and functions of human placenta trophoblasts. *Ukr Biochem J*. 2009;81(5):40–9.
14. Scotti M, Stella L, Shearer EJ, Stover PJ. Modeling cellular compartmentation in one-carbon metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2013 May 13;5(3):343–65.
15. Tibbetts AS, Appling DR. Compartmentalization of Mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2010 Aug 21;30:57–81.
16. Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J*. 1991 Sep 1;5(12):2645–51.
17. Markham GD, Pajares MA. Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Oct 27;66(4):636–48.
18. Martinov M V, Vitvitsky VM, Mosharov E V, Banerjee R, Ataullakhanov FI. A Substrate Switch: A New Mode of Regulation in the Methionine Metabolic Pathway. *J Theor Biol*. 2000 Jun;204(4):521–32.
19. Zou C-G, Banerjee R. Homocysteine and Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2005 May;7(5–6):547–59.
20. Bertolo RF, McBreairty LE. The nutritional burden of methylation reactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013;16(1):102–8.
21. De Cabo SF, Hazen MJ, Molero ML, Fernández-Piqueras J. S-adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. *Experientia*. 1994 Jul 15;50(7):658–9.
22. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, et al. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J*. 1996 Mar;10(4):471–80.
23. Hibbard BM. Folates and fetal development. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993 Apr;100(4):307–9.
24. Boss GR, Pilz RB. Decreased methionine synthesis in purine nucleoside-treated T and B lymphoblasts and reversal by homocysteine. *J Clin Invest*. 1984 Oct 1;74(4):1262–8.
25. Wolthers KR, Toogood HS, Jowitt TA, Marshall KR, Leys D, Scrutton NS. Crystal structure and solution characterization of the activation domain of human methionine

synthase. FEBS J. 2007 Feb;274(3):738–50.

26. Muratore CR, Hodgson NW, Trivedi MS, Abdolmaleky HM, Persico AM, Lintas C, et al. Age-dependent decrease and alternative splicing of methionine synthase mRNA in human cerebral cortex and an accelerated decrease in autism. PLoS One. 2013;8(2):e56927.
27. Utley CS, Marcell PD, Allen RH, Antony a C, Kolhouse JF. Isolation and characterization of methionine synthetase from human placenta. J Biol Chem. 1985 Nov 5;260(25):13656–65.
28. Boss GR. Cobalamin inactivation decreases purine and methionine synthesis in cultured lymphoblasts. J Clin Invest. 1985 Jul 1;76(1):213–8.
29. Zhu H, Wicker NJ, Shaw GM, Lammer EJ, Hendricks K, Suarez L, et al. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. Mol Genet Metab. 2003 Mar;78(3):216–21.
30. Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. Arch Biochem Biophys. 1997 Sep 1;345(1):171–4.
31. Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, et al. Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. J Biol Chem . 1993 Jun;268(16):11910–6.
32. Herbig K, Chiang E-P, Lee L-R, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. J Biol Chem. 2002 Oct 11;277(41):38381–9.
33. MacFarlane AJ, Liu X, Perry CA, Flodby P, Allen RH, Stabler SP, et al. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase regulates the metabolic partitioning of methylenetetrahydrofolate but is not essential in mice. J Biol Chem. 2008 Sep 19;283(38):25846–53.
34. Pai YJ, Leung KY, Savery D, Hutchin T, Prunty H, Heales S, et al. Glycine decarboxylase deficiency causes neural tube defects and features of non-ketotic hyperglycinemia in mice. Nat Commun. 2015;6.
35. Sudiwala S, De Castro SCP, Leung KY, Brosnan JT, Brosnan ME, Mills K, et al.

Formate supplementation enhances folate-dependent nucleotide biosynthesis and prevents spina bifida in a mouse model of folic acid-resistant neural tube defects. *Biochimie*. 2016;126.

36. Hum DW, Bell AW, Rozen R, MacKenzie RE. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *J Biol Chem*. 1988 Nov 5;263(31):15946–50.
37. Palmer AM, Kamynina E, Field MS, Stover PJ. Folate rescues vitamin B 12 depletion-induced inhibition of nuclear thymidylate biosynthesis and genome instability . *Proc Natl Acad Sci*. 2017 May 16;114(20):E4095–102.
38. Hasan T, Arora R, Bansal AK, Bhattacharya R, Sharma GS, Singh LR. Disturbed homocysteine metabolism is associated with cancer. *Exp Mol Med*. 2019 Feb 21;51(2):21.
39. Daubner SC, Schrimsher JL, Schendel FJ, Young M, Henikoff S, Patterson D, et al. A multifunctional protein possessing glycinamide ribonucleotide synthetase, glycinamide ribonucleotide transformylase, and aminoimidazole ribonucleotide synthetase activities in de novo purine biosynthesis. *Biochemistry*. 1985 Dec 3;24(25):7059–62.
40. Lane AN, Fan TW-M. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res*. 2015 Feb 27;43(4):2466–85.
41. Shimoyama M, De Pons J, Hayman GT, Laulederkind SJF, Liu W, Nigam R, et al. The Rat Genome Database 2015: genomic, phenotypic and environmental variations and disease. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D743-50.
42. Emmanuel N, Rangunathan S, Shan Q, Wang F, Giannakou A, Huser N, et al. Purine Nucleotide Availability Regulates mTORC1 Activity through the Rheb GTPase. *Cell Rep*. 2017 Jun;19(13):2665–80.
43. Yin J, Ren W, Huang X, Deng J, Li T, Yin Y. Potential Mechanisms Connecting Purine Metabolism and Cancer Therapy. *Front Immunol*. 2018 Jul 30;9.
44. Burnstock G, Boeynaems J-M. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal*. 2014 Dec 29;10(4):529–64.
45. McCarthy MT, Moncayo G, Hiron TK, Jakobsen NA, Valli A, Soga T, et al. Purine nucleotide metabolism regulates expression of the human immune ligand MICA. *J Biol Chem*. 2018 Mar 16;293(11):3913–24.

46. Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. mTOR folate sensing links folate availability to trophoblast cell function. *J Physiol*. 2017 Jul 1;595(13):4189–206.
47. Labuschagne CF, van den Broek NJF, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks ODK. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep*. 2014 May 22;7(4):1248–58.
48. Hartman SC, Buchanan JM. Nucleic Acids, Purines, Pyrimidines (Nucleotide Synthesis). *Annu Rev Biochem*. 1959 Jun;28(1):365–410.
49. Pedley AM, Benkovic SJ. A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends Biochem Sci*. 2017 Feb;42(2):141–54.
50. Momb J, Lewandowski JP, Bryant JD, Fitch R, Surman DR, Vokes SA, et al. Deletion of *Mthfd11* causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(2).
51. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem*. 1984;259(15):9508–13.
52. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(3):219–25.
53. Kery V, Poneleit L, Kraus JP. Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Jul 15;355(2):222–32.
54. Jarrett JT, Hoover DM, Ludwig ML, Matthews RG. The Mechanism of Adenosylmethionine-Dependent Activation of Methionine Synthase: A Rapid Kinetic Analysis of Intermediates in Reductive Methylation of Cob(II)alamin Enzyme †. *Biochemistry*. 1998 Sep;37(36):12649–58.
55. Olteanu H, Banerjee R. Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):35558–63.
56. Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, et al. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr*. 2001 Nov;131(11):2811–8.
57. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, et al. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Feb 28;92(5):1585–9.

58. Stipanuk MH, Dominy JE, Lee J-I, Coloso RM. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr.* 2006;136(6 Suppl):1652S-1659S.
59. Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009 Jan;7(1):10.
60. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem.* 1990 May;1(5):228–37.
61. Driggers CM, Cooley RB, Sankaran B, Hirschberger LL, Stipanuk MH, Karplus PA. Cysteine Dioxygenase Structures from pH4 to 9: Consistent Cys-Persulfenate Formation at Intermediate pH and a Cys-Bound Enzyme at Higher pH. *J Mol Biol.* 2013 Sep;425(17):3121–36.
62. Stipanuk MH, Simmons CR, Karplus PA, Dominy JE. Thiol dioxygenases: unique families of cupin proteins. *Amino Acids.* 2011 Jun;41(1):91–102.
63. Stipanuk MH, Ueki I, Dominy JE, Simmons CR, Hirschberger LL. Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino Acids.* 2009 May;37(1):55–63.
64. Tsuboyama-Kasaoka N, Hosokawa Y, Kodama H, Matsumoto A, Oka J, Totani M. Human cysteine dioxygenase gene: structural organization, tissue-specific expression and downregulation by phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999 Jun;63(6):1017–24.
65. Simmons CR, Liu Q, Huang Q, Hao Q, Begley TP, Karplus PA, et al. Crystal structure of mammalian cysteine dioxygenase. A novel mononuclear iron center for cysteine thiol oxidation. *J Biol Chem.* 2006 Jul 7;281(27):18723–33.
66. Dahl EL, Mulcahy RT. Cell-type specific differences in glutamate cysteine ligase transcriptional regulation demonstrate independent subunit control. *Toxicol Sci.* 2001 Jun;61(2):265–72.
67. Krejsa CM, Franklin CC, White CC, Ledbetter JA, Schieven GL, Kavanagh TJ. Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *J Biol Chem.* 2010 May 21;285(21):16116–24.
68. Sikalidis AK, Mazor KM, Lee J-I, Roman HB, Hirschberger LL, Stipanuk MH. Upregulation of capacity for glutathione synthesis in response to amino acid deprivation: regulation of glutamate-cysteine ligase subunits. *Amino Acids.* 2014 May;46(5):1285–96.



69. Tu Z, Anders MW. Expression and characterization of human glutamate-cysteine ligase. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Jun 15;354(2):247–54.
70. Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb;30(1–2):86–98.
71. Martsenyuk OP, Mislanova C, Romanets(Korneeva) KL, Teplyuk NM, Obolenskaya MY. The level of low molecular thiols and folate in human. *Ukr Biochem J*. 2009;81(4):94–104.
72. Powers R. The 677 C-T methylenetetrahydrofolate reductase mutation does not predict increased maternal homocysteine during pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2003 Apr;101(4):762–6.
73. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):242.
74. Botto LD, Yang Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol*. 2000 May 1;151(9):862–77.
75. Lievers KJ, Kluijtmans LA, Heil SG, Boers GH, Verhoef P, van Oppenraay-Emmerzaal D, et al. A 31 bp VNTR in the cystathionine beta-synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. *Eur J Hum Genet*. 2001 Aug;9(8):583–9.
76. Kozich V, Kraus JP. Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in *E. coli*: homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Hum Mutat*. 1992 Jan;1(2):113–23.
77. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(4):243–70.
78. Furness D, Fenech M, Dekker G, Khong TY, Roberts C, Hague W. Folate, Vitamin B12, Vitamin B6 and homocysteine: impact on pregnancy outcome. *Matern Child Nutr*. 2011 Oct;
79. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003 Jun;17(3):459–69.
80. Matté C, Scherer EBS, Stefanello FM, Barschak AG, Vargas CR, Netto CA, et al. Concurrent folate treatment prevents Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat

development. *Int J Dev Neurosci*. 2007 Dec;25(8):545–52.

81. Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, et al. Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocysteine, and Risk of Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2003 Mar 5;95(5):373–80.
82. Siniscalchi A, Mancuso F, Gallelli L, Ibbadu G, Mercuri N, Sarro G. Increase in plasma homocysteine levels induced by drug treatments in neurologic patients. *Pharmacol Res*. 2005 Nov;52(5):367–75.
83. Smith JL, Goldsmith GA, Lawrence JD. Effects of oral contraceptive steroids on vitamin and lipid levels in serum. *Am J Clin Nutr*. 1975 Apr 1;28(4):371–6.
84. Grant ECG. The Contraceptive Pill: Its Relation to Allergy and Illness. *Nutr Health*. 1983 Apr;2(1):33–40.
85. Amatayakul K, Uttaravichai C, Singkamani R, Ruckphaopunt S. Vitamin metabolism and the effects of multivitamin supplementation in oral contraceptive users. *Contraception*. 1984 Aug;30(2):179–96.
86. Hjelt K, Brynskov J, Hippe E, Lundstrom P, Munck O. Oral contraceptives and the cobalamin (vitamin B12) metabolism. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1985;64(1):59–63.
87. Kim C-S, Kim Y-R, Naqvi A, Kumar S, Hoffman TA, Jung S-B, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc. *Cardiovasc Res*. 2011 Dec 1;92(3):466–75.
88. Perła-Kaján J, Jakubowski H. Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 27;20(13):3140.
89. Naushad SM, Reddy CA, Kumaraswami K, Divyaya S, Kotamraju S, Gottumukkala SR, et al. Impact of Hyperhomocysteinemia on Breast Cancer Initiation and Progression: Epigenetic Perspective. *Cell Biochem Biophys*. 2014 Mar 10;68(2):397–406.
90. DeVilbiss EA, Mumford SL, Sjaarda LA, Connell MT, Kim K, Mills JL, et al. Preconception folate status and reproductive outcomes among a prospective cohort of folate-replete women. *Am J Obstet Gynecol*. 2019 Jul 1;221(1):51.e1-51.e10.
91. Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*. 2006 May 1;83(5):993–1016.

92. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2018 Mar 1;22(1):61–6.
93. Jung Y-M, Choi M-J. Relation of Taurine Intake During Pregnancy and Newborns' Growth. In 2019. p. 283–92.
94. Tochitani S. Functions of Maternally-Derived Taurine in Fetal and Neonatal Brain Development. In 2017. p. 17–25.
95. Holm M, Kristiansen O, Holme A, Bastani N, Horne H, Blomhoff R, et al. Placental release of taurine to both the maternal and fetal circulations in human term pregnancies. *Amino Acids.* 2018 Sep;50(9):1205–14.
96. Brown LD, Green AS, Limesand SW, Rozance PJ. Maternal amino acid supplementation for intrauterine growth restriction. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011 Jan 1;3(5535):428–44.
97. Field MS, Szebenyi DME, Stover PJ. Regulation of de novo purine biosynthesis by methenyltetrahydrofolate synthetase in neuroblastoma. *J Biol Chem.* 2006;
98. Stromberg K. The human placenta in cell and organ culture. *Methods Cell Biol.* 1980;21B:227–52.
99. Koukoura O, Sifakis S, Spandidos DA. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (Review). *Mol Med Rep.* 2012 Jan 24;5(4):883–9.
100. Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K. Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. *Placenta.* 2010 Nov;31(11):951–7.
101. Santo S Di, Malek A, Sager R, Andres A, Schneider H. Trophoblast viability in perfused term placental tissue and explant cultures limited to 7–24 hours. *Placenta.* 2003;24(8–9):882–94.
102. Blackburn DG, Starck JM. Morphological specializations for fetal maintenance in viviparous vertebrates: An introduction and historical retrospective. *J Morphol.* 2015 Nov;276(11):E1–16.
103. Sharma L, Shukla G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. *Front Med.* 2017 Jul 25;4.
104. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008;61(12):1296–302.
105. Heazell AEP, Lacey HA, Jones CJP, Huppertz B, Baker PN, Crocker IP. Effects of

- oxygen on cell turnover and expression of regulators of apoptosis in human placental trophoblast. *Placenta*. 2008 Feb;29(2):175–86.
106. Sooranna SR, Oteng-Ntim E, Meah R, Ryder T a., Bajoria R. Characterization of human placental explants: morphological, biochemical and physiological studies using first and third trimester placenta. *Hum Reprod*. 1999 Feb 1;14(2):536–41.
  107. LaMarca HL, Ott CM, Höner zu Bentrup K, LeBlanc CL, Pierson DL, Nelson AB, et al. Three-dimensional growth of extravillous cytotrophoblasts promotes differentiation and invasion. *Placenta*. 2005;26(10):709–20.
  108. Newby D, Marks L, Cousins F, Duffie E, Lyall F. Villous explant culture: characterization and evaluation of a model to study trophoblast invasion. *Hypertens pregnancy*. 2005 Jan;24(1):75–91.
  109. Tuuli MG, Longtine MS, Nelson DM. Review: Oxygen and trophoblast biology - A source of controversy. In: *Placenta*. 2011.
  110. James JL, Stone PR, Chamley LW. The effects of oxygen concentration and gestational age on extravillous trophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model. *Hum Reprod*. 2006;21(10):2699–705.
  111. Burton GJ, Jauniaux E. What is the placenta? *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(4):S6.e1-S6.e4.
  112. Sitras V, Fenton C, Paulssen R, Vårtun Å, Acharya G. Differences in Gene Expression between First and Third Trimester Human Placenta: A Microarray Study. Vol. 7, *PLoS ONE*. 2012. p. e33294.
  113. Mikheev AM, Nabekura T, Kaddoumi A, Bammler TK, Govindarajan R, Hebert MF, et al. Profiling gene expression in human placentae of different gestational ages: an OPRU Network and UW SCOR Study. *Reprod Sci*. 2008;15(9):866–77.
  114. McKay J, Xie L, Adriaens M, Evelo C, Ford D, Mathers J. Organ-Specific Gene Expression Changes in the Fetal Liver and Placenta in Response to Maternal Folate Depletion. *Nutrients*. 2016 Oct 22;8(10):661.
  115. Kirsch SH, Herrmann W, Obeid R. Genetic defects in folate and cobalamin pathways affecting the brain. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Jan 1;51(1).
  116. Lewis RM, Godfrey KM, Jackson AA, Cameron IT, Hanson MA. Low Serine Hydroxymethyltransferase Activity in the Human Placenta Has Important Implications for Fetal Glycine Supply. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Mar;90(3):1594–8.

117. Crider KS, Yang TP, Berry RJ, Bailey LB. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr*. 2012 Jan 1;3(1):21–38.
118. Guéant J-L, Namour F, Guéant-Rodriguez R-M, Daval J-L. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol Metab*. 2013 Jun;24(6):279–89.
119. Kalhan SC. One-carbon metabolism, fetal growth and long-term consequences. *Nestle Nutr Inst Work Ser*. 2013;74:127–38.
120. Korneeva KL, Rodriguez RR, Ralchenko S V. Expression of genes, encoding the enzymes of cysteine metabolism in human placenta in the first and third trimesters of uncomplicated pregnancy. *Ukr Biochem J*. 2016 Feb 29;88(1):88–98.
121. Obolenskaya MY, Tokovenko BT, Kuklin A V., Frolova AA, Rodriguez RR, Dotsenko VA, et al. The start of systems biology in Ukraine. *Biopolym Cell*. 2015;30(1):16–24.
122. Resendis-Antonio O, González-Torres C, Jaime-Muñoz G, Hernandez-Patiño CE, Salgado-Muñoz CF. Modeling metabolism: A window toward a comprehensive interpretation of networks in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014;30:79–87.
123. Rodríguez A, Infante D. Network models in the study of metabolism. *Electron J Biotechnol*. 2009 Oct 15;12(4).
124. Khodayari A, Zomorodi AR, Liao JC, Maranas CD. A kinetic model of *Escherichia coli* core metabolism satisfying multiple sets of mutant flux data. *Metab Eng*. 2014 Sep;25:50–62.
125. Reed MC, Thomas RL, Pavisic J, James SJ, Ulrich CM, Nijhout HF. A mathematical model of glutathione metabolism. *Theor Biol Med Model*. 2008;5:8.
126. Achcar F, Camadro J-M, Mestivier D. A Boolean probabilistic model of metabolic adaptation to oxygen in relation to iron homeostasis and oxidative stress. *BMC Syst Biol*. 2011 Jan 13;5(1):51.
127. Forger DB, Peskin CS. Stochastic simulation of the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):321–4.
128. García-Olivares A, Villarroel M, Marijuán PC. Enzymes as molecular automata: a stochastic model of self-oscillatory glycolytic cycles in cellular metabolism. *Biosystems*. 2000 May;56(2–3):121–9.

129. Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. What is flux balance analysis? *Nat Biotechnol.* 2010 Mar;28(3):245–8.
130. Chandrasekaran S, Price ND. Probabilistic integrative modeling of genome-scale metabolic and regulatory networks in *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 12;107(41):17845–50.
131. Mardinoglu A, Gatto F, Nielsen J. Genome-scale modeling of human metabolism - a systems biology approach. *Biotechnol J.* 2013 Sep;8(9):985–96.
132. Stalidzans E, Seiman A, Peebo K, Komasilovs V, Pentjuss A. Model-based metabolism design: constraints for kinetic and stoichiometric models. *Biochem Soc Trans.* 2018 Apr 17;46(2):261–7.
133. Klamt S, Regensburger G, Gerstl MP, Jungreuthmayer C, Schuster S, Mahadevan R, et al. From elementary flux modes to elementary flux vectors: Metabolic pathway analysis with arbitrary linear flux constraints. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(4):e1005409.
134. Schuster S, Hilgetag C. On elementary flux modes in biochemical reaction systems at steady state. *J Biol Syst.* 1994 Jun 21;02(02):165–82.
135. Maertens J, Vanrolleghem PA. Modeling with a view to target identification in metabolic engineering: A critical evaluation of the available tools. *Biotechnol Prog.* 2010 Jan;26(2):NA-NA.
136. Hädicke O, Klamt S. EColiCore2: A reference network model of the central metabolism of *Escherichia coli* and relationships to its genome-scale parent model. *Sci Rep.* 2017;7(January):1–15.
137. De Martino A, Granata D, Marinari E, Martelli C, Van Kerrebroeck V. Optimal Fluxes, Reaction Replaceability, and Response to Enzymopathies in the Human Red Blood Cell. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1–10.
138. Raškevičius V, Mikalayeva V, Antanavičiūtė I, Ceslevičienė I, Skeberdis VA, Kairys V, et al. Genome scale metabolic models as tools for drug design and personalized medicine. Lebedeva I V, editor. *PLoS One.* 2018 Jan 5;13(1):e0190636.
139. Sharma NS, Ierapetritou MG, Yarmush ML. Novel quantitative tools for engineering analysis of hepatocyte cultures in bioartificial liver systems. *Biotechnol Bioeng.* 2005 Nov 5;92(3):321–35.
140. Costa RS, Hartmann A, Vinga S. Kinetic modeling of cell metabolism for microbial production. *J Biotechnol.* 2016 Feb 10;219:126–41.

141. Milne CB, Kim P-J, Eddy JA, Price ND. Accomplishments in genome-scale in silico modeling for industrial and medical biotechnology. *Biotechnol J.* 2009 Dec;4(12):1653–70.
142. Zhang C, Hua Q. Applications of Genome-Scale Metabolic Models in Biotechnology and Systems Medicine. *Front Physiol.* 2016 Jan 7;6.
143. Mardinoglu A, Nielsen J. Systems medicine and metabolic modelling. *J Intern Med.* 2012 Feb;271(2):142–54.
144. Tepper N, Shlomi T. Efficient modeling of MS/MS data for metabolic flux analysis. *PLoS One.* 2015;
145. Kamp A v., Schuster S. Metatool 5.0: fast and flexible elementary modes analysis. *Bioinformatics.* 2006 Aug 1;22(15):1930–1.
146. Schellenberger J, Que R, Fleming RMT, Thiele I, Orth JD, Feist AM, et al. Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc.* 2011 Sep 4;6(9):1290–307.
147. Resau J, Sakamoto K, Cottrell J. Explant organ culture: a review. *Cytotechnology.* 1991;7(3):137–49.
148. Miller RK, Genbacev O, Turner M a, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta.* 2005 Jul;26(6):439–48.
149. Reti NG, Lappas M, Huppertz B, Riley C, Wlodek ME, Henschke P, et al. Effect of high oxygen on placental function in short-term explant cultures. *Cell Tissue Res.* 2007 Jun;328(3):607–16.
150. Baczyk D, Dunk C, Huppertz B, Maxwell C, Reister F, Giannoulas D, et al. Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. *Placenta.* 2006;27(4–5):367–74.
151. An S, Kumar R, Sheets ED, Benkovic SJ. Reversible Compartmentalization of de Novo Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells. *Science (80- ).* 2008 Apr 4;320(5872):103–6.
152. Лебедев АТ. Масс-спектрометрия в органической химии. Терентьев ПБ, editor. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2003. 493 p.
153. Zamboni N, Fendt S-M, Rühl M, Sauer U. (13)C-based metabolic flux analysis. *Nat Protoc.* 2009 Jan;4(6):878–92.

154. Zamboni N. <sup>13</sup>C metabolic flux analysis in complex systems. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 Feb;22(1):103–8.
155. Wang W, Fridman A, Blackledge W, Connely S, Wilson I a., Pilz R, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cassette regulates purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem.* 2009;284(6):3521–8.
156. Watson WH, Song Z, Kirpich IA, Deaciuc I V, Chen T, McClain CJ. Ethanol exposure modulates hepatic S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the isolated perfused rat liver through changes in the redox state of the NADH/NAD(+) system. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1812(5):613–8.
157. Morrow GP, MacMillan L, Lamarre SG, Young SK, MacFarlane AJ, Brosnan ME, et al. In vivo kinetics of formate metabolism in folate-deficient and folate-replete rats. *J Biol Chem.* 2015;290(4).
158. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhorji G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science (80- ).* 2017 Aug 18;357(6352):eaan2507.
159. Brodsky G, Barnes T, Bleskan J, Becker L, Cox M, Patterson D. GARS-AIRS-GART Gene Encodes Two Proteins Which Are Differentially Expressed during Human Brain Development and Temporally Overexpressed in Cerebellum. *Hum Mol ....* 1997;6(12):2043–50.
160. Schuster S, Fell DA, Dandekar T. *Nature Biotechnology* 2000 Schuster. 2000;18(March):1–7.
161. Trinh CT, Wlaschin A, Srien F. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009 Jan;81(5):813–26.
162. Trinh CT, Liu Y, Conner DJ. Rational design of efficient modular cells. *Metab Eng.* 2015 Nov;32:220–31.
163. Raijmakers MTM, Peters WHM, Steegers EAP, Poston L. Amino thiols, detoxification and oxidative stress in pre-eclampsia and other disorders of pregnancy. *Curr Pharm Des.* 2005 Jan;11(6):711–34.
164. Vollset SE, Clarke R, Lewington S, Ebbing M, Halsey J, Lonn E, et al. Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: Meta-analyses of data on 50 000 individuals. *Lancet.* 2013;381(9871).



165. de Franchis R, Sebastio G, Mandato C, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677T C mutation, and role of folate. *Lancet*. 1995 Dec;346(8991–8992):1703.
166. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, et al. The “thermolabile” variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet*. 1999 Apr;64(4):1045–55.
167. de Franchis R, Buoninconti A, Mandato C, Pepe A, Sperandeo MP, Del Gado R, et al. The C677T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is a moderate risk factor for spina bifida in Italy. *J Med Genet*. 1998 Dec 1;35(12):1009–13.
168. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995 May;10(1):111–3.
169. Birsan C, Litescu SC, Radu GL. A Novel HPLC-PDA-MS Method for S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine Routine Analysis. *Anal Lett*. 2010 Feb 18;43(5):793–803.
170. Burren KA, Mills K, Copp AJ, Greene NDE. Quantitative analysis of s-adenosylmethionine and s-adenosylhomocysteine in neurulation-stage mouse embryos by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2006 Nov 21;844(1):112–8.
171. Gellekink H, van Oppenraaij-Emmerzaal D, van Rooij A, Struys EA, den Heijer M, Blom HJ. Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma. *Clin Chem*. 2005 Aug 1;51(8):1487–92.
172. Liigand J, Laaniste A, Kruve A. pH Effects on Electrospray Ionization Efficiency. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2017 Mar 13;28(3):461–9.
173. Hinshaw J V. Nonlinear calibration. *LCGC North Am*. 2002 Nov;20(4):120–6.
174. Kirkup L, Mulholland M. Comparison of linear and non-linear equations for univariate calibration. *J Chromatogr A*. 2004 Mar 12;1029(1–2):1–11.
175. Del Monte U. Does the cell number  $10^9$  still really fit one gram of tumor tissue? *Cell Cycle*. 2009 Feb 28;8(3):505–6.
176. Cairns RA, Mak TW. The current state of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2016

Oct 23;16(10):613–4.

177. Panetta JC, Paugh SW, Evans WE. Mathematical modeling of folate metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 5(5):603–13.
178. Nijhout HF, Reed MC, Budu P, Ulrich CM. A Mathematical Model of the Folate Cycle. *J Biol Chem.* 2004 Dec 31;279(53):55008–16.
179. Reed MC, Gamble M V., Hall MN, Nijhout HF. Mathematical analysis of the regulation of competing methyltransferases. *BMC Syst Biol.* 2015 Dec 14;9(1):69.
180. Misselbeck K, Marchetti L, Field MS, Scotti M, Priami C, Stover PJ. A hybrid stochastic model of folate-mediated one-carbon metabolism: Effect of the common. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–12.
181. Desforges M, Parsons L, Westwood M, Sibley CP, Greenwood SL. Taurine transport in human placental trophoblast is important for regulation of cell differentiation and survival. *Cell Death Dis.* 2013 Jan;4:e559.
182. Tsitsiou E, Sibley CP, D’Souza SW, Catanescu O, Jacobsen DW, Glazier JD. Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta. *J Inherit Metab Dis.* 2011 Feb 22;34(1):57–65.
183. Solanky N, Requena Jimenez A, D’Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta.* 2010 Feb;31(2):134–43.
184. Pavlivskiy Y, Ralchenko S, Olifirov B, Obolenska M. Conditional knock-out of gene GART in HELA cells with CRISPR-CAS9 system. In: XVIII International conference of students and young scientists “Shevchenkivska vesna: bioscience advances.” Kyiv; 2020. p. 148–51.
185. Aimi J, Qiu H, Williams J, Zalkin H, Dixon JE. De novo purine nucleotide biosynthesis: cloning of human and avian cDNAs encoding the trifunctional glycinamide ribonucleotide synthetase-aminoimidazole ribonucleotide synthetase-glycinamide ribonucleotide transformylase by functional complementation in E. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(22):6665–72.
186. Kan JLC, Jannatipour M, Taylori SM, Moran RG. Mouse cDNAs encoding a trifunctional protein of de novo purine synthesis and a related single-domain glycinamide ribonucleotide synthetase. *Gene.* 1993;137(2):195–202.
187. Henikoff S, Keene MA, Sloan JS, Bleskan J, Hards R, Patterson D. Multiple purine pathway enzyme activities are encoded at a single genetic locus in *Drosophila*. *Proc*

Natl Acad Sci U S A. 1986;83(3):720–4.

188. Rudolph J, Stubbe J. Investigation of the Mechanism of Phosphoribosylamine Transfer from Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase to Glycinamide Ribonucleotide Synthetase. *Biochemistry*. 1995 Feb;34(7):2241–50.
189. Schendel FJ, Cheng YS, Otvos JD, Wehrli S, Stubbe J. Characterization and chemical properties of phosphoribosylamine, an unstable intermediate in the de novo purine biosynthetic pathway. *Biochemistry*. 1988 Apr 5;27(7):2614–23.
190. Cheng YS, Murray M, Schendel F, Otvos J, Wehrli S, Stubbe J. Chemical characterization of phosphoribosylamine, a substrate for newly discovered trifunctional protein containing glycineamide ribonucleotide synthetase activity. *Adv Enzyme Regul*. 1987 Jan;26:319–33.
191. Sutherland RL, Hall RE, Taylor IW. Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Res*. 1983 Sep;43(9):3998–4006.
192. Moser G, Windsperger K, Pollheimer J, de Sousa Lopes SC, Huppertz B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochem Cell Biol*. 2018 Oct 26;150(4):361–70.
193. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177(6):1395–401.
194. Taysi S, Keles MS, Gumustekin K, Akyuz M, Boyuk A, Cikman O, et al. Plasma homocysteine and liver tissue S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine status in vitamin B6-deficient rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Jan;19(1):154–60.
195. Eloranta TO. Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines. *Biochem J*. 1977 Sep 15;166(3):521–9.
196. Backer CL, Mongé MC. Of mice and men.... *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016 Jun;151(6):1769–70.
197. Shlomi T, Fan J, Tang B, Kruger WD, Rabinowitz JD. Quantitation of cellular metabolic fluxes of methionine. *Anal Chem*. 2014 Feb 4;86(3):1583–91.
198. Banister CE, Koestler DC, Maccani MA, Padbury JF, Houseman EA, Marsit CJ. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epigenetics*. 2011;6(7):920–7.

199. Constância M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature*. 2004 Nov 3;432(7013):53–7.
200. Meister A. Glutathione. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, editors. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1988. p. 401–17.
201. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2954–9.
202. Huppertz B, Ghosh D, Sengupta J. An integrative view on the physiology of human early placental villi. *Prog Biophys Mol Biol*. 2014 Jan;114(1):33–48.
203. Morrish DW, Dakour J, Li H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*. 1998 Aug;39(1–2):179–95.
204. Hannibal L, Blom HJ. Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? *Mol Aspects Med*. 2017 Feb;53:36–42.
205. Mansour A, Harb H, Abdelhafee M. Diagnostic Value of Homocysteine and Other Preeclampsia Markers: Relationship with Severity. *Int J Biol Chem*. 2011 Apr 1;5(4):227–37.
206. Clarke S, Banfield K. S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases. In: Carnel R, Jacobsen DW, editors. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 63–78.
207. Yokochi T, Robertson KD. Preferential Methylation of Unmethylated DNA by Mammalian de Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):11735–45.
208. Kareta MS, Botello ZM, Ennis JJ, Chou C, Chédin F. Reconstitution and Mechanism of the Stimulation of de Novo Methylation by Human DNMT3L. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):25893–902.
209. Yang H, Ara AI, Magilnick N, Xia M, Ramani K, Chen H, et al. Expression pattern, regulation, and functions of methionine adenosyltransferase 2beta splicing variants in hepatoma cells. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):281–91.
210. Dasarathy J, Gruca LL, Bennett C, Parimi PS, Duenas C, Marczewski S, et al. Methionine metabolism in human pregnancy 1 – 3. *Am J Clin Nutr*. 2010;
211. Zhu BT, Wu KY, Wang P, Cai MX, Conney AH. O -Methylation of Catechol

Estrogens by Human Placental Catechol- O -Methyltransferase: Interindividual Differences in Sensitivity to Heat Inactivation and to Inhibition by Dietary Polyphenols. *Drug Metab Dispos.* 2010 Oct;38(10):1892–9.

212. Janošík M, Kery V, Gaustadnes M, Maclean KN, Kraus JP. Regulation of Human Cystathionine  $\beta$ -Synthase by S -Adenosyl- l -methionine: Evidence for Two Catalytically Active Conformations Involving an Autoinhibitory Domain in the C-Terminal Region †. *Biochemistry.* 2001 Sep;40(35):10625–33.
213. Bai H-W, Shim J-Y, Yu J, Zhu BT. Biochemical and Molecular Modeling Studies of the O -Methylation of Various Endogenous and Exogenous Catechol Substrates Catalyzed by Recombinant Human Soluble and Membrane-Bound Catechol- O -Methyltransferases †. *Chem Res Toxicol.* 2007 Oct;20(10):1409–25.
214. Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb 17;20(4):867.
215. Zou T, Yang W, Hou Z, Yang J. Homocysteine enhances cell proliferation in vascular smooth muscle cells: role of p38 MAPK and p47phox. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2010 Dec;42(12):908–15.
216. Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, Sundaramoorthy E, Mahajan A, Sharma A, et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis.* 2006 Jan 23;5:1.
217. Khayati K, Antikainen H, Bonder EM, Weber GF, Kruger WD, Jakubowski H, et al. The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice. *FASEB J.* 2017 Feb;31(2):598–609.
218. Sauer J, Mason JB, Choi S-W. Too much folate: a risk factor for cancer and cardiovascular disease? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009 Jan;12(1):30–6.
219. Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, et al. Cell Lines A Systematic Profile of DNA Methylation in Human Cancer A Systematic Profile of DNA Methylation in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res [CANCER Res.* 2003;63(63):1114–21.
220. Friso S, Choi S-W, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects

genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci.* 2002 Apr 16;99(8):5606–11.

221. Pizzolo F, Blom HJ, Choi SW, Girelli D, Guarini P, Martinelli N, et al. Folic acid effects on s-adenosylmethionine, s-adenosylhomocysteine, and DNA methylation in patients with intermediate hyperhomocysteinemia. *J Am Coll Nutr.* 2011 Feb;30(1):11–8.
222. Reed MC, Nijhout HF, Neuhouser ML, Gregory JF, Shane B, James SJ, et al. A mathematical model gives insights into nutritional and genetic aspects of folate-mediated one-carbon metabolism. *J Nutr.* 2006;136(10):2653–61.
223. Murphy MM, Fernandez-Ballart JD. Homocysteine in pregnancy. *Adv Clin Chem.* 2011;53:105–37.
224. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Sep;76(18):3479-3496.
225. Larhlimi A, Blachon S, Selbig J, Nikoloski Z. Robustness of metabolic networks: a review of existing definitions. *Biosystems.* 2011 Oct;106(1):1-8.
226. Lopez-Quesada E, Vilaseca MA, Laila JM. Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 108:45–49.
227. Ronnenberg AG, Venners SA, Xu X, Chen C, Wang L, Guang W et al. Preconception B-vitamin and homocysteine status, conception, and early pregnancy loss. *Am J Epidemiol.* 2007; 166:304–312.
228. Ghandour H, Chen Z, Selhub J, Rozen R. Mice deficient in methylenetetrahydrofolate reductase exhibit tissue-specific distribution of folates. *J Nutr.* 2004 Nov;134(11):2975-8.
229. Ivanov, M. V. Cheripco, N. V. Kosolapova, E. N. Prochan. Preeclampsia: Speciality of Pathogenesis and Therapeutic Tactics. *Tavrish Medical And Biological Vestnik.*

2012, 15(2), part 2(58): 273 – 286.

230. Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Arch Pharm Res.* 2018 Apr;41(4):372-383.
231. Hussain T, Tan B, Ren W, Rahu N, Kalhoro DH, Yin Y. Exploring polyamines: Functions in embryo/fetal development. *Anim Nutr.* 2017; 3(1):7-10. doi: 10.1016/j.aninu.2016.12.002.
232. Cindrova-Davies T, Herrera EA, Niu Y, Kingdom J, Giussani DA, Burton GJ. Reduced cystathionine  $\gamma$ -lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator. *Am J Pathol.* 2013;182(4):1448-58.
233. Kawasaki K, Kondoh E, Chigusa Y, Kawamura Y, Mogami H, Takeda S, Horie A, Baba T, Matsumura N, Mandai M, Konishi I. Metabolomic Profiles of Placenta in Preeclampsia. *Hypertension.* 2019;73(3):671-679.
234. Braekke, K., Ueland, P., Harsem, N. et al. Homocysteine, Cysteine, and Related Metabolites in Maternal and Fetal Plasma in Preeclampsia. *Pediatr Res.* 2007; 62:319–324

# ДОДАТКИ

## Додаток А. Стехіометрична матриця.

	(MAT)	(Meth/Mases)	(SAHH)	(MS)	(MTHFR)	(MTD)	(MTCY)	(FTS)	(DHFR)	(SHMT)	(PGT)	(AICART)	(TS)	(CBS)	(CTGL)	(CD)	(SADC)	(HDH)	(GCL)	(GS)	(Taur trans)	(Met trans)	(Cys trans)	(Glut trans)	(Ser trans)	(Gly trans)	(GSH trans)
H2O	-1	0	-1	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	
THF	0	0	0	1	0	0	0	-1	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	0	
CH2THF	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	1	0	0	-1	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
H	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ph	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Met	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
Gly	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	
Ser	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
AICAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SAH	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SulfAa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CHOTHF	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glut	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	0	
GSH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-1	
DHF	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
hcytaur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Taur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	
SAM	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	
GlutCys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	
Cst	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Hcy	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cys outL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	
Fmt	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Gly outL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	
CHTHF	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dUMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FICAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dUMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Smet	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
S	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NHS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
oxbt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
O2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CH3THF	0	0	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NADPH	0	0	0	0	-1	1	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NAD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
NADH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	
taur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
ATP	-1	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	
ADP	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
dhh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	
GAR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Taurex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
Met outL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	
NADP	0	0	0	0	1	-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glut outL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	
Ser outL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	
Adh	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
GSH out	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	