

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Родрігеса Руслана Рейнальдовича

“Молекулярні особливості фолат-залежного метаболізму в плаценті людини в нормі, при гіпергомоцистеїнемії та в залежності від поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази в дослідженнях *in vivo*, *ex vivo* та *in silico*”,

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

Актуальність роботи. До числа патологічних чинників, здатних порушувати процеси розвитку плода, відноситься підвищення рівня гомоцистеїну (ГЦ) в крові матері (гіпергомоцистеїнемія). Гомоцистеїн не тільки порушує функціонування материнського організму, але й діє безпосередньо на плід, завдяки його здатності проникати через плацентарний бар'єр. Наслідком цих процесів є чисельні ускладнення вагітності.

Гомоцистеїн задіяний в роботі декількох метаболічних циклів, тому його рівень в плазмі крові може змінюватися при генетичних дефектах експресії ферментів, які каталізують реакції цих метаболічних шляхів, при недостатності вітамінів (В9, В6 і В12), порушенні гормональної регуляції. В зв'язку з цим вивчати причини і наслідки гіпергомоцистеїнемії важко. Клінічне дослідження гіпергомоцистеїнемії у вагітних жінок ускладнено, так як початок хвороби вимагає негайної медичної допомоги для запобігання негативним наслідкам для матері і плоду. Обчислювальне моделювання може відігравати важливу роль у розумінні механізмів перерозподілу метаболічних потоків при гіперцистеїнемії поряд з використанням високопродуктивних експериментальних методів дослідження.

Виходячи зі сказаного вище, дисертаційна робота Родрігеса Руслана Рейнальдовича, присвячена дослідженню молекулярних особливостей фолат-залежного метаболізму в плаценті людини в нормі, гіпергомоцистеїнемії та в залежності від поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази актуальна.

Загальна характеристика роботи. Дисертаційна робота Родрігеса Руслана Рейнальдовича складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації – 156 сторінок. Робота містить 9 рисунків, 17 таблиць. Список використаної літератури охоплює 223 найменування.

В розділі 1 «Огляд літератури» Руслан Рейнальдович проаналізував досить велику кількість сучасних літературних наукових даних за темою роботи та обґрунтував необхідність проведення своїх досліджень. Проаналізовані сучасні уявлення щодо фолат-залежного метаболізму, вплив поліморфізму генів, залучених до фолат-залежного метаболізму та гомоцистеїну на розвиток патологічних станів організму. Охарактеризовані сучасні підходи до математичного моделювання метаболічних мереж.

В розділі «Матеріали і методи» описані сучасні молекулярно-біологічні методи, які були використані під час виконання дисертаційної роботи, а саме: визначення експресії генів фолатного циклу, виділення і кількісне визначення вмісту SAM і SAH методом твердофазної екстракції і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії, виділення і кількісний аналіз пуринових основ методом кислотного гідролізу і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії. Описані етапи створення і аналізу стехіометричної моделі фолат-залежних процесів палаценти людини з використанням програмного забезпечення Metatool та COBRAToolbox.

В розділі «Результати експериментальних досліджень» представлені результати досліджень, виконаних автором роботи:

- Досліджено зміни в експресії генів метаболізму фолатів і спряжених з ним процесів транссульфування і синтезу глутатіону залежно від триместру вагітності. Показано, що синтез ферментів синтезу пуринів, реметилування гомоцистеїну і цистатіонін- β -синтазу відбувається на обох строках гестації, в третьому триместрі менш інтенсивно, ніж в першому. Вперше в зразках з першого і третього триместрів виявлено одночасну присутність

повнорозмірних мРНК і білка трифункціонального гена GART і його укороченої форми.

- Створено і проаналізовано стехіометричну модель фолат-залежного метаболізму в плаценті людини на основі реакцій, які відбуваються в цитоплазмі. Розраховані і проаналізовані елементарні потоки, оптимальний перерозподіл потоків реакцій при умовно нормальному функціонуванні фолат-залежного метаболізму плаценти, за умов двократного збільшення концентрації гомоцистеїну, С677Т-мутації гена MTHFR, та за умов дії обох чинників. Показана важливість участі серину у підтриманні системи фолат-залежного метаболізму, процесів транссульфування та синтезу глутатіону. На основі виконаного математичного моделювання показана можлива участь надлишкового гомоцистеїну у процесах синтезу метіоніну і глутатіону, його вплив на функціонування фолатного циклу та синтезу пуринових основ *de novo*.

- Виконана експериментальна перевірка результатів стехіометричного моделювання роботи метаболічної мережі. В плаценті людини визначено концентрацію S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну і їх співвідношення, а також концентрацію пуринів і інтенсивність їх синтезу *de novo*.

У розділі «Аналіз та узагальнення отриманих результатів» Руслан Рейнальдович провів детальний аналіз власних досягнень та порівняв їх із даними, отриманими іншими авторами. Він показав, що прогнози щодо перерозподілу метаболічних потоків при збільшення концентрації гомоцистеїну та С677Т-мутації гена MTHFR, отримані в ході математичного моделювання підтверджені в експерименті підвищеним синтезом SAM і SAH і зниженим синтезом пуринів.

Зроблені Русланом Рейнальдовичом висновки повністю відповідають отриманим результатам. Основні наукові положення та висновки дисертаційної роботи знайшли відображення в опублікованих 5

експериментальних статтях у провідних фахових виданнях, 2-х оглядових статтях та тезах 7и доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані наукові результати є новими, вони мають як наукове, так і практичне значення. 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 тканинспецифічних особливостей експресії генів, проведено *in silico* симуляцію підвищеного вмісту гомоцистеїну і С677Т мутації в гені MTHFR. Вперше визначено вміст пуринів, S-аденозилметіоніну та S-аденозилгомоцистеїну в плаценті, показана зміна цих показників під впливом підвищеної концентрації гомоцистеїну, яка імітує помірну гіпергомоцистеїнемію. Вперше зміни у метаболічних потоках, передбачені на основі симуляції підвищеного вмісту гомоцистеїну у стехіометричній моделі фолат-залежного метаболізму, були підтверджені в експерименті з плацентарними експлантами.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати та математична модель можуть бути використана для оцінки ризику виникнення ускладнень вагітності під впливом дії екзогенних (дієта, прийом лікарських засобів) і ендогенних (поліморфізм генів, що кодують ензими) факторів.

Поряд з наведеними позитивними сторонами дисертаційної роботи, є і недоліки:

1. Проводити симуляцію підвищеного вмісту гомоцистеїну шляхом підвищення експресії SAH-гідролази недоцільно, так як цей фермент каталізує зворотну реакцію. Підвищення експресії останнього збільшить пряму, так і зворотну реакції.

2. В авторефераті у таблиці 4, у роботі таблиця 4.1 наведені експериментальні дані без посилання на джерело, тому сприймаються як авторські.

На мій погляд було б доцільно почути думку Руслана Рейнальдовича стосовно деяких дискусійних питань:

1. Що автор роботи розуміє під стаціонарним станом системи? Які стани системи описуються стехіометричними моделями? Чому розрахунки для умовно нормального стану фолат-залежного метаболізму автор називає стаціонарним, а за умов навантаження гомоцистеїном, чи у випадку C677T мутації в гені MTHFR – уникає використання цього терміну?

2. Наскільки коректно порівнювати вміст SAM і SAH в тканині і в експлантах?

3. За вашими даними вміст SAM у плаценті варіює від 8,33-18,73 нмоль/г тканини. Вміст SAM в імплантах при інкубуванні їх в присутності гомоцистеїну 16,45 нмоль/г тканини. Чи можна вважати, що вплив гомоцистеїну був негативним?

4. В роботі показано, що підвищений гомоцистеїн переробляється на метіонін і потім на SAM і SAH. Цей факт відомий, і автор також його підтверджує своїми дослідженнями і детально аналізує у п. 4.3.1. Проте автор стверджує що ці дані отримані вперше. Що малося на увазі?

5. Обговорюючи наслідки підвищення SAM і SAH автор детально зупиняється на роботі деяких плацентарних метилтрансфераз, які не були предметом дослідження. Автор дисертації наводить значення K_m і K_i для цих ферментів. Чи будуть концентрації SAM і SAH плаценти впливати на швидкість цих реакцій?

6. Наскільки коректно порівнювати результати синтезу пуринів у плаценті з аналогічними результатами дослідження клітинної лінії MCF-7, що має пухлинне походження?

7. Не вказано генотип плацентарних експлантів з якими проводили досліди. Не вказано кількість зразків, які були досліджені на вміст SAM, SAH та пуринів.

8. Прошу автора ще раз зупинитися на практичному значенні своєї роботи. Як він вважає, чи можна вважати концентрацію гомоцистеїну 20 μM

токсичною, та такою, що приводить до появи негативних наслідків і порушення роботи фолатного і метіонінового циклів?

Вищезазначені питання не знижують наукової цінності дисертаційної роботи, оскільки вони стосуються представлення та інтерпретації результатів.

Висновок щодо відповідності дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до кандидатських дисертацій. Дисертаційна робота Родрігеса Руслана Рейнальдовича "Молекулярні особливості фолат-залежного метаболізму в плаценті людини в нормі, при гіпергомоцистеїнемії та в залежності від поліморфізму гена метилентетрагідрофолатредуктази в дослідженнях *in vivo*, *ex vivo* та *in silico*", є цілісною, закінченою науковою працею. За своєю актуальністю, методичним рівнем, науковою новизною і практичною цінністю отриманих результатів ця дисертація відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013р., (зі змінами, внесеними згідно Постановами Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08. 2015р., №1159 від 30.12. 2015р. та №567 від 27.07.2016 р., №943 від 20.11.2019р., №), які пред'являються до кандидатських дисертацій, а Руслан Рейнальдович заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03. – молекулярна біологія.

Офіційний опонент,

завідувач кафедри біофізики і фізіології

Донецького національного університету імені Василя Стуса,

кандидат хімічних наук, доцент

Ольга ДОЦЕНКО

