

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ**

РОДРІГЕС РУСЛАН РЕЙНАЛЬДОВИЧ



УДК 577.218

**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

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в групі системної біології відділу ензимології білкового синтезу Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник: професор, доктор біологічних наук
Оболенська Марія Юріївна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
керівник групи системної біології відділу ензимології
білкового синтезу.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
Данилович Юрій Володимирович,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії м'язів;

кандидат хімічних наук, доцент,
Доценко Ольга Іванівна,
Донецький Національний Університет ім. Василя Стуса,
доцент кафедри біофізики і фізіології.

Захист дисертації відбудеться «28» вересня 2021 року о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: 03680, м.Київ, вул. Ак. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за адресою: 03680, м.Київ, вул. Ак. Заболотного, 150.

Автореферат розісланий «28» серпня 2021 року.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради
Кандидат біологічних наук, с.н.с.



I.V. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Knöfler et al., 2019). 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 %) (Ivanov et al., 2012). Вирішення проб леми 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 матері і дитини 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 статусу (Cairns et al., 2011). До значної міри ці вимоги задовольняє фолат-залежний метаболізм одновуглецевих 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 АТФ і NADPH, а через пов'язаний з ним синтез глутатіону опосередковано регулює окисно-відновний статус в клітині (Stover et al., 2009; Fox & Stover, 2008). 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 (Hoxhaj et al., 2017).

Загальновизнаним 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 супрово-

джує численні мультифакторні захворювання людини і, зокрема, викидні, преек-лампсію, передчасні пологи, відшарування плаценти (Lopez-Quesada et al., 2003; Ronnenberg et al., 2007). 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 вітаміна В12, багата на білки дієта, вік людини тощо), які можуть призводити до гіпергомоцистеїнемії, а от з яких клітин/тканин/органів гомоцистеїн потрапляє в кров і за якої патології – питання, на яке поки що немає чіткої відповіді (Kim et al., 2018). З приводу другої підпроблеми відомі численні наслідки гіпергомоцистеїнемії, які проявляються у зміні активності певних білків, внутрішньоклітинних процесів, функціонуванні органів і систем (Kim et al., 2018), а щодо механізму 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 (гомоцистеїнілює) їх, що впливає на структуру і функції білків (Jakubowski et al., 2018). 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 (Zou et al., 2009). Не виключено, що це обумовлено клітинспецифічними особливостями експресії фолатзалежних генів (Chen et al., 2010) і концентрацією відповідних метаболітів в клітинах різного типу (Ghandour et al., 2004). Даних щодо тканоспецифічних особливостей фолат-залежного метаболізму обмаль, і 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 аміно-кислот L, A і y+L, метаболізується і потрапляє у кровообіг плоду через таку ж трійку систем транспорту амінокислот, які розташовані на базальній мембрані цитотрофобласту (Tsitsiou et al., 2011). 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 (Braekke et al., 2007). Таким чином гомоцистеїн 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-β-синтаза; концентрація гомоцистеїну, метіоніну, цистеїну і глутатіону в плаценті залежить від генотипу *MTHFR* (метилентетрагідрофолатредуктази), концентрації фолатів у тканині і від наявності/відсутності патологічного процесу; екзогенний гомоцистеїн, який ex vivo імітує гіпергомоцистеїне-

мію, знижує проліферативний індекс і підвищує апоптотичний індекс в плацентарних експлантах і активує цистатіонін- β -синтазу (Mishlanova et al., 2011; Martsenyuk et al., 2009). Молекулярні засади такого впливу гіпергомоцистеїнемії на процеси в плаценті невідомі, що робить їх дослідження своєчасним і важливим

Для дослідження складних метаболічних систем в останні роки набули популярності моделі метаболізму *in silico*, що варіюють як за ступенем деталізації, так і за математичними підходами (Salgado-Muñoz et al., 2014). На сьогодні створено кілька варіацій моделей фолат-залежного метаболізму, проте жодної яка б враховувала особливості плаценти людини (Ulrich et al., 2008). Серед різних моделей стехіометричні мають оптимальний баланс між необхідною кількістю входних даних і передбачувальною потужністю моделі. Стехіометричні моделі дозволяють у найпростіший спосіб оцінити в першому наближенні як збалансовані між собою метаболічні потоки і як зміни в одних реакціях впливають на всі реакції системи (Palsson et al., 2010). Стехіометричне моделювання метаболічних процесів і фолат-залежного метаболізму, зокрема, є перспективним напрямком дослідження тканинспецифічних особливостей метаболізму.

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 підвищений вміст гомоцистеїну 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.
2. Обрати реакції для реконструкції стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму в плаценті людини з урахуванням тканинспецифічних 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 підвищений вміст гомоцистеїну і визначити його вплив на фолат-залежні процеси.
5. *In silico* симулювати мутацію С677Т у гені *MTHFR* і визначити її вплив на фолат-залежні процеси.
6. *In silico* симулювати мутацію С677Т у гені *MTHFR* і підвищений вміст гомоцистеїну у системі і визначити їх вплив на фолат-залежні процеси.
7. Провести симуляцію підвищеного вмісту гомоцистеїну в експерименті і визначити її наслідки для життєво важливих процесів синтезу пуринів, S-

аденозилметіоніну і S-аденозилгомоцистеїну (SAH) 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, зворотна транскрипція і кількісна полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (ЗТ-кПЛР). Аналітичні методи: вискоелективна 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 тканинспецифічних особливостей експресії генів, проведено *in silico* симуляцію підвищеного вмісту гомоцистеїну і C677T 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 помірну 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 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.

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. Стехіометрична модель фолат-залежного метаболізму може бути використана для аналізу процесів у різних тканинах і клітинах з урахуванням тканино/клітинспецифічних особливостей біологічного матеріалу. 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, включаючи 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. Луциком. Здобувачем також особисто виконано культивування експлантів плаценти людини, виділення ДНК та РНК, визначення експресії генів, задіяних у фолат-залежному метаболізмі, методом ЗТ-кПЛР в реальному часі. Культивування клітинної лінії MCF-7 виконано з допомогою Косач Вікторії Романівни, к.б.н., м.н.с. відділу сигнальних систем клітини Інституту Молекулярної Біології і Генетики НАНУ. Високоєфективна рідинна хроматографія/масс-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 4й 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), IX 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 7-и 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 –

156 сторінок. Робота містить 9 рисунків, 17 таблиць. Список використаної літератури охоплює 223 найменування, з них кирилицею – 3, латиницею — 220.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

В огляді літератури проаналізовано сучасні уявлення щодо фолат-залежного метаболізму, його метіонінового і тетрагідрофолатного циклів і зв'язку фолат-залежних процесів із транссульфуванням і синтезом глутатіону. В літогляді описано як поліморфізм генів, залучених до фолат-залежного метаболізму, і гомоцистеїн як загально визнаний маркер фолат-залежного метаболізму впливають на функціонування клітин. Окремий розділ присвячено плаценті, її структурі, розвиткові і особливостям фолат-залежного метаболізму в цьому органі. Висвітлені підходи до моделювання метаболічних процесів, типи метаболічних моделей з більш детальним аналізом стехіометричних моделей і засад, на яких реконструюються стехіометричні моделі, і методи їх аналізу.

Матеріали та методи досліджень. В роботі використано чотири групи методів: біоінформатичні, молекулярно-біологічні, аналітичні і статистичні.

Біоінформатичні методи для реконструкції і аналізу стехіометричної моделі фолат-залежних процесів включають: 1) створення стехіометричної матриці системи; 2) введення обмежень у систему, а саме пошук значення метаболічних потоків, при якому добуток матриці на потік (групу потоків) набуває нульового значення, що відповідає стаціонарному стану системи; 3) пошук ключових метаболітів системи і елементарних мод; 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 C677T мутації в гені *MTHFR* на функціонування всіх ланок фолат-залежного метаболізму.

Модель побудована на основі даних про стехіометрію і напрям реакцій. Для аналізу метаболічної мережі, а саме ключових метаболітів та елементарних мод, використали програмне забезпечення Metatool (Kamp, Schuster, 2006); для визначення величини метаболічних потоків - програмне забезпечення YANA, а для моделювання і аналізу балансу потоків за різних умов функціонування системи - програмне забезпечення COBRAToolbox (Schellenberger 2011). Все програмне забезпечення знаходиться у відкритому доступі. В якості цільової функції обрано максимально ефективну роботу всіх ланок системи або максимізацію всіх потоків.

Методи молекулярно-біологічних досліджень. Об'єктом дослідження були зразки суцільної тканини плаценти і плацентарні експланти з першого і третього триместрів гестації. Зразки були зібрані у районних пологових будинках № 2 і №3 (Київ, Україна) та в Ірпінському пологовому будинку (Ірпінь, Україна). Для дослідження було відібрано зразки з неускладненою вагітністю.

Для отримання експлантів зразки плаценти, приблизно 5 г, промивали від крові в охолоджену стерильну фізрозчині, забуференому фосфатами (PBS, рН 7,2). Від тканини відділяли шматочки 1-3 мм з ворсинками хоріону і переносили у культуральні плашки з різним середовищем залежно від типу експерименту. Для визначення експресії генів та концентрації SAM і SAH

експланти культивували в DMEM/Ham's-F12 (кат.номер D6421, Sigma) середовищі, для визначення концентрації пуринів – в середовищі MEM (кат. номер 51412C, Sigma) з додаванням ^{13}C -2 гліцину до кінцевої концентрації 80 μM і збідненої на пурини ембріональної сироватки великої рогатої худоби до 10 % за об'ємом. Дослідні і контрольні зразки експлантів культивували в атмосфері 5 % CO_2 і 20 % O_2 при 37 °C протягом 24 год.; до дослідних зразків через 4 год. після початку культивування додавали гомоцистеїн до кінцевої концентрації 20 μM і 40 μM .

Визначення експресії генів фолатного циклу. Виділення тотальної РНК із зразків суцільної тканини плаценти проводили з тризолом; кДНК отримували з набором реагентів Revert Aid M-MuLV First Strand Synthesis Kit (Thermo), а ампліфікацію кДНК в реальному часі проводили з реагентами для ПЛР, які містять SYBRGreen1. Кількісний вміст мРНК визначали за допомогою стандартних кривих. Праймери підбирали на межі двох екзонів, щоб уникнути ампліфікації геномної ДНК, за допомогою безкоштовної онлайн-програми PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Inc., США). Унікальність праймерів перевіряли за допомогою онлайн-інструментів Blast (NCBI, США) і рестрикційного аналізу.

Експресію гена CDO визначали на рівні білка за допомогою вестерн-блот аналізу, розділяючи сумарні білки за допомогою електрофорезу в 5-12 % PAGE. Мембрану PVDF з перенесеними на неї білками інікубували з первинними антитілами проти Cysteine Dioxygenase Type 1, а після стандартного відмивання мембрани - з вторинними антитілами. Білки проявляли з хемілюмінесцентним реактивом, сигнал реєстрували за використання приладу Chemi-Doc, а оптичну густину смуг визначали за допомогою програми GelPro 3.1.

Виділення і кількісне визначення вмісту SAM і SAH методом твердофазної екстракції і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії (ВЕРХ-МС). Експланти розтирали з рідким азотом, додаючи 0,5 М HClO_4 . Проби центрифугували, відбирали супернатант та доводили 10 % розчином аміаку до рН 6,8; супернатант пропускали через колонки для твердофазної екстракції (Agilent BondElut PBA). Стандарти SAM, SAH та їхню суміш розводили у розчині 0,1 М оцтової кислоти в день аналізу. ВЕРХ-МС виконували 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 μm). Колонки елюювали ізократичною мобільною фазою вода - 10% метанол, доведеною оцтовою кислотою до рН 5,0 впродовж 12 хв. при швидкості потоку 0,5 мл/хв.

Виділення і кількісний аналіз пуринових основ методом кислотного гідролізу і високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії. До клітин MCF-7 в кількості $(3 - 7) \cdot 10^6$ та розтертих з рідким азотом плацентарних експлантів (~ 0,5 г) додавали 0,4 М HClO_4 і піддавали ультразвуковій дезінтеграції, потім гідролізували на киплячій водяній бані протягом 60 хв., охолоджували на льоду, нейтралізували 5М КОН і центрифугували. Супернатант зберігали при -20 °C до аналізу. Для контролю за процесом передобробки до кожного зразка перед гідролізом додавали 200 нг кофеїну в якості внутрішнього стандарту.

Умови ВЕРХ-МС були такими, як і при визначенні вмісту SAM і SAH, але в якості мобільної фази для визначення пуринів використовували 60% розчину А (0,1М NH₄Ac з 10% метанолом, доведеним до рН 5,0 мурашиною кислотою) та 40% розчину В (деіонізована вода). Час елюювання 10 хв.

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 U критерій Манна-Уїтні, W критерій Вілкоксона, T-тест Стьюдента і one-way ANOVA і *post hoc* Newman-Keuls тест для визначення статистичної надійності різниці між даними, яка вважалася статистично значущою при $p < 0.05$. Статистичну обробку даних проведено в програмі STATISTICA 10 Enterprise 10.0.1011.6, StatSoft, Inc.

Результати досліджень та обговорення

Реконструкція стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму та її аналіз за умови початкових обмежень і при симуляції підвищеного вмісту гомоцистеїну і С677Т генотипу гена *MTHFR*

Фолат-залежні процеси і ензими, які в них беруть участь, мають тканиноспецифічний характер. Найкраще фолат-залежні процеси досліджені в печінці експериментальних тварин і людини. Перед тим як створювати модель для плаценти необхідно було перевірити які гени експресуються в плаценті.

Ми проаналізували експресію генів, які кодують ензими реакцій, наведених на рис. 1 за базою даних Human Protein Atlas [<https://www.proteinatlas.org/>]. З'ясувалось, що на відміну від печінки в плаценті експресується ізоформа метіонін-аденозилтрансферази (MAT) 2a замість 1a, відсутня експресія генів гліцин-н-метилтрансферази і бетаїнгідроксиметилтрансферази. Через відсутність в базі Human Protein Atlas даних щодо експресії генів *цистатіонін-β-синтази (CBS)*, *цистатіонін-γ-ліази (CTGL)* і *цистеїндіоксигенази (CDO)*, їх визначили експериментально разом з генами фолат-залежного метаболізму, які відповідають за синтез пуринів і за реметилування гомоцистеїну. Крім того, ці визначення провели в зразках плаценти з першого і третього триместрів гестації (табл. 1). Виявили, що перелічені гени в плаценті людини експресуються і на першому і на третьому триместрах гестації. Таким чином за даними Human Protein Atlas і власними дослідженнями для реконструкції стехіометричної моделі фолат-залежного метаболізму в плаценті були обрані реакції, наведені на рис.1.

глутатіону) є нижчими в третьому триместрі порівняно з першим; концентрація транскриптів *TYMS* (тимідилатсинтаза) майже не змінюється при переході від першого до третього триместру.

Таблиця 1

Концентрація мРНК в зразках плаценти з I і III триместрів гестації

<i>мРНК</i>	Копії мРНК/нг тотальної РНК медіана (Q _{ниж.} ; Q _{верх.})	
	I триместр	III триместр
<i>GARS-AIRS-GART</i>	20,2 (11,07; 31,65)	17,5 (11,3; 23,35)
<i>GARS</i>	91,3 (67,55; 116,5)	33,7** (25,67; 40,4)
<i>ATIC</i>	346,5 (286,25; 395,5)	136,0** (81,72; 171,5)
<i>TYMS</i>	24,8 (17,5; 46,25)	27,05 (15,32; 44,9)
<i>MS</i>	81,1 (54,15; 105,4)	30,9* (22,5; 44,9)
<i>CBS</i>	14,1 (11,47; 20,55)	5,2** (3,06; 7,45)
<i>CDO</i>	15,5 (9,3; 31,2)	238,1** (232,4; 296,8)
<i>GCLC</i>	45,2 (41,0; 51,9)	22,1 (7,2; 44,9)

Примітка. При порівнянні концентрацій мРНК між першим і третім триместром статистична значущість різниці позначена однією зірочкою при $p < 0,05$ і двома зірочками при $p < 0,01$.

Виключенням із загальної тенденції є мРНК *CDO*, концентрація якої зростає майже на порядок в третьому триместрі порівняно з першим. Ця різниця підтверджується і на рівні білка (рис. 2). Підвищення експресії *CDO* у третьому триместрі порівняно з першим, ймовірно, пов'язано з усталеним кровообігом між матір'ю і плацентою і потраплянням значної кількості цистеїну в плаценту, який таким чином знешкоджується через активацію його катаболізму.

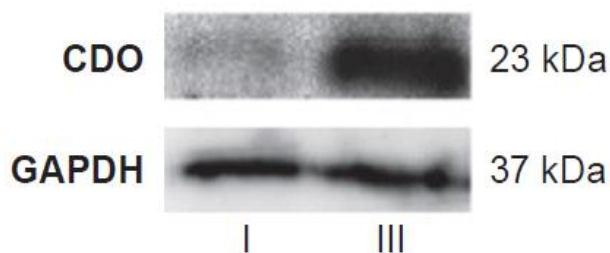


Рис.2 Вміст білків CDO і GAPDH в зразках плаценти з першого і третього триместрів гестації

Структура метаболічної мережі. Метаболічну мережу охарактеризували через визначення ключових метаболітів і елементарних мод. Сім ключових метаболітів, не враховуючи воду, наведені у спадному порядку залежно від частоти їх участі у реакціях: тетрагідрофолат (6), метилентетрагідрофолат (4), формілтетрагідрофолат (4), метіонін (3), гомоцистеїн (3), серин (3) і цистеїн (3).

Елементарна мода - це унікальний набір 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. Серед 27 реакцій виокремлено 23 елементарних моди. 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).

Баланс метаболічних потоків у фолат-залежних процесах. На підставі введених базових обмежень (принцип умовної стаціонарності системи, закон збереження мас і $v \geq 0$) і використовуючи додатковий принцип оптимальності (об'єктивна функція – максимально ефективна робота системи) змодельовані 4 варіанти функціонування системи – умовно стаціонарний стан за початкових обмежень в системі та за максимально ефективною її роботи і три варіанти аномалій: 1) двократне збільшення концентрації гомоцистеїну (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: $H_2O + SAH = Adp + Hcy$ збільшено вдвічі); 2) C677T-мутація гена *MTHFR* (потік *MTHFR*: $CH_2THF + H + NADPH = NADP + 5mthf$ складав 65% від вихідного) і 3) гетерозиготне C677T-носійство гена *MTHFR* в комбінації зі збільшенням концентрації гомоцистеїну.

Баланс метаболічних потоків за початкових обмежень в умовно стаціонарному стані системи. За початкових умов найбільша питома вага належить імпорту серину. 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 (Tibbets, Appling, 2010). Знижену активність SHMT розглядають як одну із причин незрощення нервової трубки у плода (Chen et al., 2010).

Аналіз балансу потоків дав змогу оцінити, які з потоків переважно утилізують гомоцистеїн. За початкових умов потік транссульфування в плаценті у 2,5 рази більший за потік реметилування (CBS проти MS) (рис.3). Дослідження інших тканин засвідчує, що обидва процеси рівнозначні за своїм внеском в утилізацію гомоцистеїну (Finkelstein, 2000).

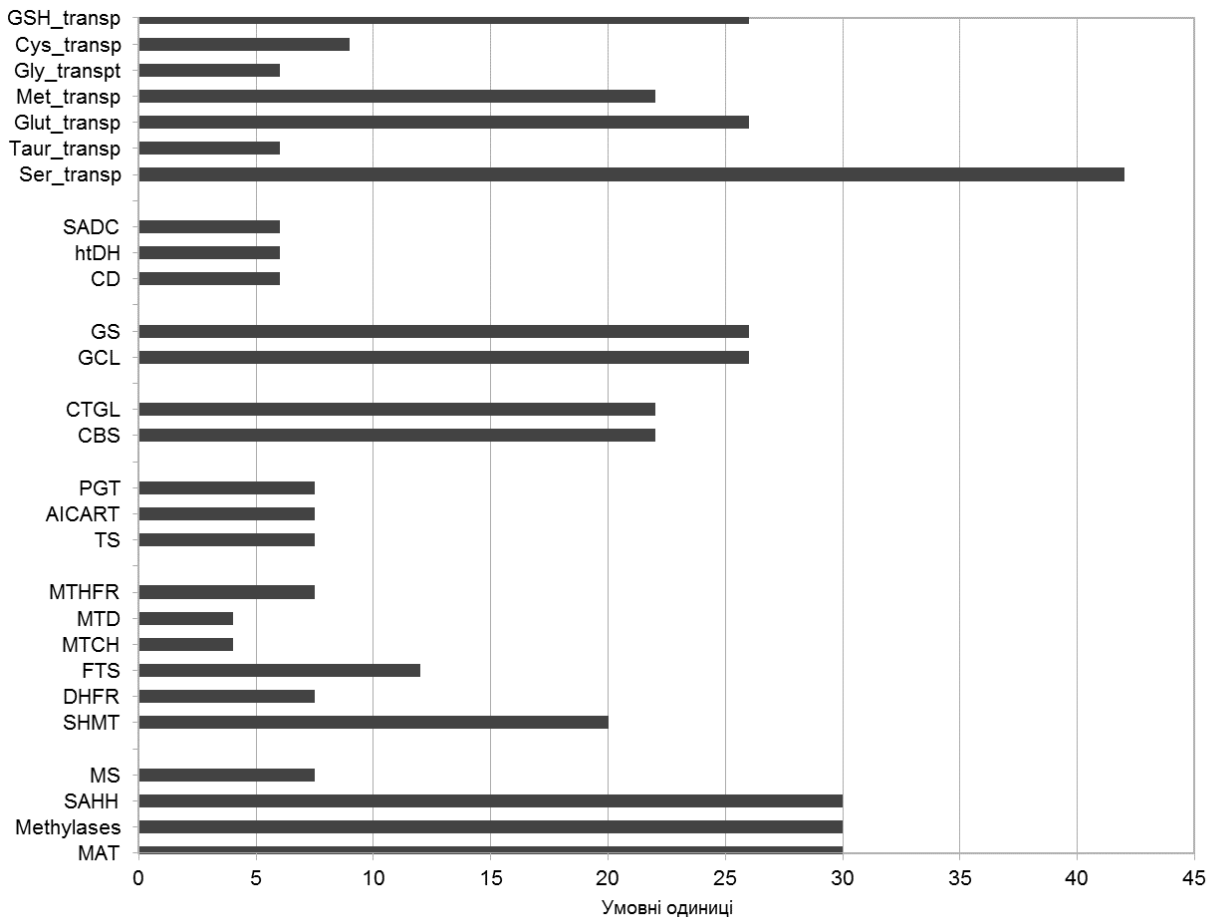


Рис.3 Питова вага метаболічних потоків у фолат-залежному метаболізмі (умовні одиниці)

Баланс метаболічних потоків за умов симуляції підвищеного вмісту гомоцистеїну. Двократне навантаження системи гомоцистеїном призводить до зниження на 72% потоку через реакції MTCH і MTD (які ведуть до утворення 10-формілтетрагідрофолату, необхідного для синтезу пуринів *de novo*). Відповідно, знижуються на 30% потоки через реакції синтезу пуринів AICART і PGT. Загалом знижуються потоки через всі реакції фолатного циклу окрім MTHFR. Натомість активуються шляхи реметилювання та транссульфування (табл.2).

Баланс метаболічних потоків за умов симуляції С677Т генотипу MTHFR.

Введення в систему іншої умови, С677Т генотипу *MTHFR*, призводить до зниження потоку через реакцію реметилювання, що майже не впливає на інші потоки метіонінового циклу. Дещо знижується потік через реакцію SHMT, внаслідок чого зменшується утворення гліцину і метилентетрагідрофолату, що компенсується зростанням імпорту гліцину ззовні. *MTHFR* конкурує з MTD і TS за 5,10-метилентГФ. Тому, коли активність *MTHFR* знижена, більше 5,10-метилентГФ стає доступним для використання у синтезі пуринів і піримідинів. За низького значення потоку *MTHFR*, більше навантаження по утилізації гомоцистеїну лягає на шлях транссульфування, опосередкований ензимами CBS і CTGL (Табл.2).

Баланс метаболічних потоків за умов симуляції *C677T* генотипу *MTHFR* і підвищеного вмісту гомоцистеїну. Навантаження гомоцистеїном в разі носійства гетерозиготної форми *MTHFR* призводить до майже зворотної ситуації: потік через ензим CBS зростає, поглинаючи надлишок гомоцистеїну за меншої «допомоги» з боку метіонінсинтази (MS). Конкуренція за серин між CBS і SHMT при активації CBS призводить до зменшеного утворення CH₂THF серингідроксиметилтрансферазою. Саме тому ми спостерігаємо зниження потоків MTD, MTCH і пов'язаних з ними PGT і AICART (табл. 2).

Таблиця 2.

Зміни потоків через реакції фолат-залежного метаболізму (у %% відносно початкових значень потоків, прийнятих за 100%)

Номер п/п	Потік	2xHcy	<i>MTHFR C677T</i> генотип	2xHcy + <i>MTHFR C677T</i>
Реакції метонінового 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
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

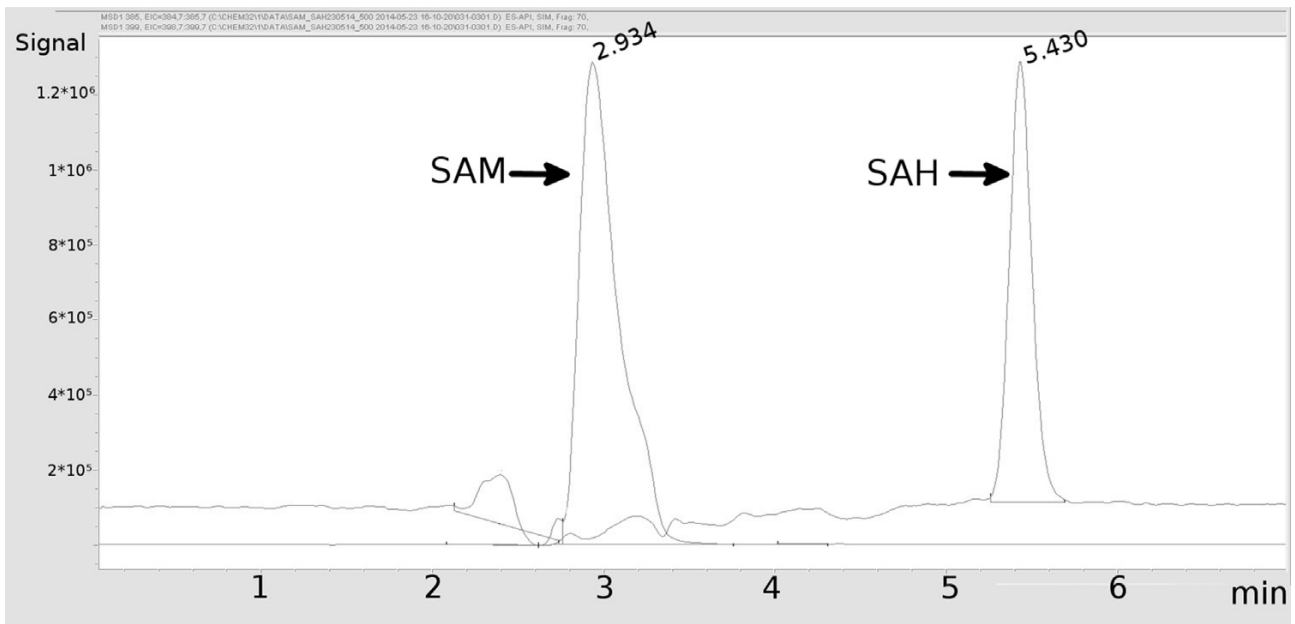
продовження Табл 2.

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	GS	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 її симуляції наведено у відносних одиницях. За 100 % прийняті значення потоків у вихідному стані. Hcy — гомоцистеїн. Жирним шрифтом виділено зростання потоків більш ніж на 10%, курсивом позначено зниження потоків більш ніж на 10%.

Експериментальне перевірка передбачень, зроблених на основі стехіометричної моделі

Вплив помірної гомоцистеїнемії на вміст SAM і SAH. Кількісне визначення SAM і SAH базується на чіткому розділенні і детекції цих метаболітів за допомогою ВЕРХ-маспектрометрії і використанні стандартних кривих (рис. 4). Розділення проводили на ВЕРХ-колонці C18 на ВЕРХ-системі Agilent 1200 з детекцією наодноквадрупольному мас-спектрометрі Agilent 6100.

Рис. 4. Хроматограма суміші SAM (2×10^{-4} моль/л) та SAH (2×10^{-4} моль/л).

Цифри біля кожного піку показують точний час утримання SAM і SAH в концентраціях - 2×10^{-8} ; 5×10^{-8} ; 2×10^{-7} ; 2×10^{-6} ; 5×10^{-6} ; 10×10^{-6} і 2×10^{-5} моль/л тричі вимірювали для побудови калібрувальних кривих

В експлантах в присутності гомоцистеїну майже в два рази підвищується концентрація SAM, SAH і при цьому зберігається незмінним співвідношення SAM/SAH (Табл.3).

Таблиця 3

Концентрація SAM і SAH в тканині плаценти і культивованих експлантах плаценти

Зразки	SAM, нмоль/г (Нижні – верхні квартилі)	SAH, нмоль/г (Нижні – верхні квартилі)	SAM/SAH (Нижні – верхні квартилі)
Тканина плаценти	9.99 (8.33 - 18.73)	5.57 ^{♦♦} (5.20 - 8.74)	2.22 ^{♦♦} (1.86 - 2.64)
Експланти	8.44 [*] (7.48 - 10.55)	1.07 ^{♦♦} (1.06 - 2.01)	5.53 ⁺ (5.17 - 7.32)
Експланти + 20 μ M Гомоцистеїн	16.3 [*] (8.74 - 16.45)	1.8 ^{♦♦} (1.59 - 2.56)	5.92 [*] (5.69 - 6.80)

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

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. Тому підвищення рівнів SAM і SAH неоднаково впливає на різні метилтрансферази і може призводити до розбалансування процесів метилювання.

Оскільки SAH є конкуруючим із SAM інгібітором метилтрансферази, то рівняння Міхаеліса – Ментен набуває вигляду

$$\text{Частка максимальної каталітичної швидкості} = \frac{[SAM]}{K_m + K_m[SAH]/K_i + [SAM]},$$

де [SAM] і [SAH] - концентрації метаболітів (Clarke, Banfield, 2001).

В якості прикладу ми обрали дві метилтрансферази – DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3A (DNMT3A, КФ: 2.1.1.37) і катехол-О-метилтрансферазу (COMT, КФ 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 (Yokochi, Robertson 2002; Kareta et al., 2006). Аберантна DNMT3A критична для розвитку преекламписії (Yang 2002; Dasarathy 2010). COMT каталізує О-метилювання катехолових естрогенів таких, як 2- і 4-гідроксіестрадіол (2-ОН-Е2 і 4-ОН-Е2), які в плаценті людини є мажорними продуктами окислення 17 α -естрадіолу й естрону (Zhu et al, 2010). Знижена активність COMT асоціюється з преекламписією (Kraus et al., 2001). Кінетичні константи DNMT3A (Yokochi, Robertson, 2002; Kareta et al., 2006) і розчинної форми COMT, S-COMT (Bai et al., 2007), наведені в таблиці 4 разом із часткою максимальної каталітичної активності обох ензимів в плаценті й плацентарних експлантах у присутності й відсутності гомоцистеїну.

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

Кінетичні константи і частка максимальної кінетичної активності ензимів DNMT3A і S-COMT.

Ензим	SAM Km (μM)	SAH Ki (μM)	Частка максимальної активності в абсолютних, μM/хв., і відносних (в дужках) одиницях		
			Тканина плаценти	Культивовані 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: За одиницю прийняті показники частки максимальної активності у суцільній тканині плаценти. Hcy — гомоцистеїн. Абсолютні значення концентрацій SAM і SAH, нмоль/г в плацентарній тканині і плацентарних експлантах див. в таблиці 3.

Вплив гіпергомоцистеїнемії на синтез пуринів *de novo*. Кількісне визначення аденіну, гуаніну і гіпоксантину і інтенсивності їх синтезу *de novo* базується на розділенні азотистих основ за допомогою ВЕРХ-мас спектрометрії, використанні ¹³C-2 гліцину для визначення новостворених азотистих основ і стандартних кривих для кількісного визначення аналітів (рис. 5).

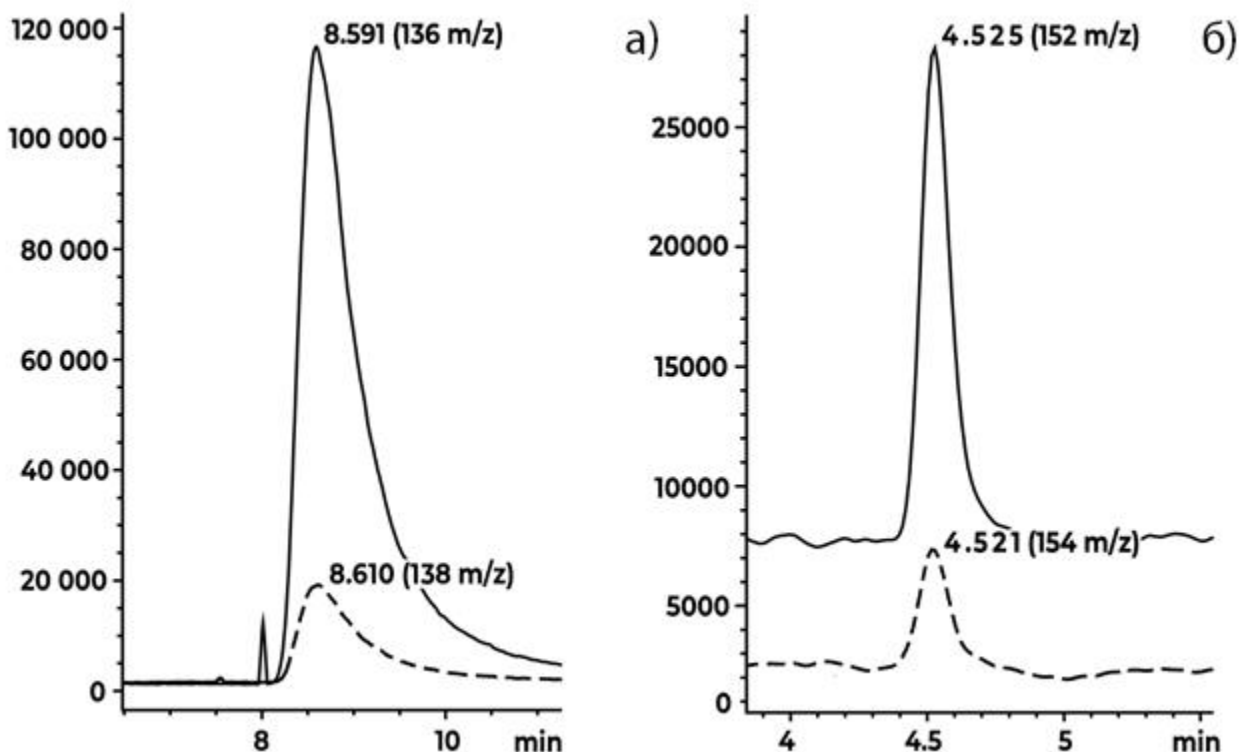


Рис. 5. Хроматограма гідролізатів експлантів плаценти. Немічені (суцільні лінії) і мічені (пунктирними лініями) а) аденін та б) гуанін у експлантах плаценти, культивованих без гомоцистеїну.

Метод дозволяє чітко розділити аденін і гуанін, дещо гірше гуанін і гіпоксантин і відокремити новосинтезовані основи з двома ^{13}C карбонами від немічених азотистих основ за величиною m/z .

Культивування як експлантів, так і клітин MCF-7 з 20 μM гомоцистеїном виявило зниження концентрації загальних та новосинтезованих пуринів. Зміни внаслідок культивування експлантів з першого триместру з 40 μM гомоцистеїном є більш виразними (табл.5).

Таблиця 5

Вміст мічених і мічених об'єднаних з неміченими (всі) пуринами в експлантах і клітинах MCF-7

Нсу, μM	Плацентарні експланти				MCF-7 клітини	
	I триместр		III триместр		Мічені пурини	Всі пурини
	Мічені пурини	Всі пурини	Мічені пурини	Всі пурини		
0	0.10 ± 0.006	8.8 ± 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 ± 0.005	6.7 ± 0.47	-	-	3,91 $\pm 0,672$	9,89 $\pm 1,830$
40	0.022 ± 0.001	4.4 ± 0.24	-	-	-	-

Отже, стехіометричне моделювання фолат-залежного метаболізму в плаценті людини допомогло визначити як помірна гіпергомоцистеїнемія і поліморфізм гена *MTHFR* впливають на різні ланки цієї системи. Передбачення, отримані на основі моделі, були підтверджені в експерименті.

Для реметилування гомоцистеїну донором метильної групи є метилтетрагідрофолат, який утворюється з метилентетрагідрофолату шляхом відновлення ензимом MTHFR. Метилентетрагідрофолат постачає одну вуглецеву групу одразу для трьох метаболічних шляхів (рис.6) – для реметилування (ензими MTHFR і MS), для синтезу тимідилату (ензим TS) і для синтезу формілтетрагідрофолату (ензими MTD, MTH), який використовується в синтезі пуринових нуклеотидів (ензими PGT та AICART) і постачає в пуринове кільце атоми карбону C2 і C8. Через те, що в клітині фолати знаходяться в «дефіциті», і ензими конкурують за них, то при зміні концентрації гомоцистеїну за законом діючих мас відбувається зсув метаболічних потоків в бік реметилування за рахунок реакцій фолатного циклу і синтезу пуринів *de novo*, зокрема. Про це свідчить зниження на 30% метаболічного потоку через реакції біосинтезу пуринів, передбачене стехіометричною моделлю і підтверджене в експерименті

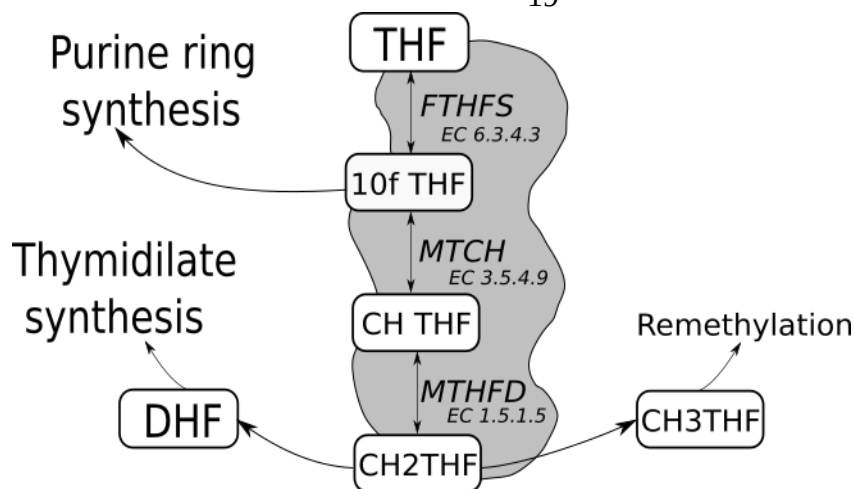


Рис.6. Метилентетрагідрофолат(CH₂THF) у трьох конкуруючих метаболічних шляхах

Висновки.

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

1. В плаценті людини з першого і третього триместрів гестації вперше показано, що гени, які кодують ензими синтезу пуринів, реметилування гомоцистеїну і цистатіонін-β-синтазу, експресуються на обох строках 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 вкороченої 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, CH₂THF, CH₃THF, 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 підвищеного вмісту гомоцистеїну призводить до зміни метаболічних потоків у системі і, зокрема, до

зсуву в бік реакцій метіонінового циклу і транссульфування за рахунок реакцій фолатного циклу і синтезу пуринових основ de novo.

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 підвищеного вмісту гомоцистеїну щодо перерозподілу метаболічних потоків у системі підтверджені в експерименті підвищеним синтезом SAM і SAH і зниженим синтезом пуринів.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ВИКОНАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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., Корнеєва Л., Ральченко С., Вакулєнко 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, Lushchuk, 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 β 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, Корнеєва. 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.

АНОТАЦІЯ

Родрігес Р.Р. 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*. –рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 - молекулярна біологія. - Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України.

Дисертація присвячена аналізу молекулярних особливостей фолат-залежного метаболізму (ФЗМ) в плаценті людини та впливу підвищеної концентрації гомоцистеїну і С677Т мутації гена *MTHFR* на метаболічні потоки. Для системного аналізу було створено стехіометричну модель ФЗМ із урахуванням тканинспецифічної експресії генів. Моделювання підвищеної концентрації гомоцистеїну у системі змінює метаболічні потоки через більшість реакцій ФЗМ і, зокрема, призводить до зсуву метаболічних потоків в бік реметилування за рахунок зниження реакцій фолатного циклу і синтезу пуринових основ. Моделювання С677Т генотипу гена *MTHFR* призводить до незначного зниження метаболічних потоків, які йдуть на реакції метіонінового циклу, і підвищення тих, які йдуть на процеси синтезу пуринів. Передбачення моделі щодо впливу гомоцистеїну на реакції метіонінового циклу і синтезу пуринів *de novo* перевірені і підтверджені в експерименті з плацентарними експлантатами методом високоефективної рідинної хроматографії/мас-спектрометрії.

Ключові слова: плацента, фолат-залежний метаболізм, експресія генів, моделювання метаболізму, гомоцистеїн, поліморфізм *MTHFR*, синтез пуринів, SAM і SAH.

АННОТАЦИЯ

Родригес Р.Р. Молекулярные особенности фолат-зависимого метаболизма в плаценте человека в норме, при гипергомоцистеинемии и в зависимости от полиморфизма гена метилентетрагидрофолатредуктазы в исследованиях *in vivo*, *ex vivo* и *in silico*. – рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Диссертация посвящена анализу молекулярных особенностей фолат-зависимого метаболизма (ФЗМ) в плаценте человека и влияния повышенной концентрации гомоцистеина и С677Т мутации гена *MTHFR* на метаболические потоки. Для системного анализа системы была создана стехиометрическая модель ФЗМ с учетом тканеспецифической экспрессии генов. Моделирование повышенной концентрации гомоцистеина в системе как следствие предполагаемой гипергомоцистеинемии, меняет метаболические потоки через большинство реакций ФЗМ и, в частности, приводит к смещению метаболических потоков в сторону

реметилування за счет снижения реакций фолатного цикла и синтеза пуриновых оснований. Моделирование C677T генотипа гена MTHFR приводит к незначительному снижению метаболических потоков, которые направлены на реакции метионинового цикла, и повышению направленных на процессы синтеза пуриновых оснований. Предсказания модели относительно влияния гомо-цистеина на реакции метионинового цикла и синтез пуринов de novo проверены и подтверждены в эксперименте с плацентарными эксплантатами методом високоефективной жидкостной хроматографии / масс-спектрометрии.

Ключевые слова: плацента, фолат-зависимый метаболизм, экспрессия генов, моделирование метаболизма, гомоцистеин, полиморфизм *MTHFR*, синтез пуринов, SAM и SAH.

SUMMARY

Rodriguez R.R. Molecular features of folate-dependent metabolism in the human placenta are normal, in hyperhomocysteinemia and depending on the polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in in vivo, ex vivo and in silico studies. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of the candidate of biological sciences on a specialty 03.00.03 - molecular biology. - Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The dissertation is devoted to the analysis of molecular features of folate-dependent metabolism (FOCM) in the human placenta and the influence of elevated concentrations of homocysteine and C677T mutation in the *MTHFR* gene on metabolic fluxes.

Hyperhomocysteinemia (elevated level of Hcy) often accompanies pregnancy disorders related to placental dysfunctions. Homocysteine is the toxic intermediate of folate-dependent one-carbon metabolism, but exact mechanisms of its adverse effects are still debated. One-carbon metabolism supplies substrates and cofactors for methylation reactions, polyamine synthesis, purine ring and thymidylate synthesis thus making difficult to assess homocysteine impact on a system level.

In such cases one can exploit mathematic models of metabolism. Among them stoichiometric models offer the best balance between required data input and predictive power. For system analysis, a stoichiometric model of FOCM was created, taking into account tissue-specific gene expression. For the latter mRNA expression analysis of folate-dependent metabolism genes was conducted in 1st trimester and term placenta. Model was analyzed for key metabolites, elementary modes. Four cases were simulated: normal metabolite fluxes and wild-type enzymes; elevated homocysteine concentration with activation of direct SAHH reaction (direct input of homocysteine by transport reaction has not yield data that align with experiments); decreased activity of MTHFR due to C677T genotype; combination of both adverse factors. Simulation of elevated homocysteine concentrations in the system alters metabolic fluxes through most FOCM reactions and, in particular, shifts metabolic fluxes toward remethylation

by reducing folate cycle reactions and purine base synthesis. Modeling of the C677T genotype of the *MTHFR* gene leads to a slight decrease in metabolic fluxes to the methionine cycle reaction, and an increased reactions of purine synthesis.

The prediction of the model was tested experimentally on placental explant culture either in normal conditions and with added 20 μ M Hcy, with in-house developed assays for S-adenosylmethione (SAM) and S-adenosylhomocysteine content, as well as for purine bases. Content of universal methylation substrate SAM and its product SAH metabolites was measured in explants by high performance liquid chromatography / mass spectrometry (HPLC/MS). Purine synthesis *de novo* was assayed by adding to the explant culture heavy (^{13}C) glycine and monitoring its appearance in purine ring by HPLC/MS. Experimental evidence supported model predictions about activation of methionine cycle and slowdown of purine synthesis due to competition for the limited folate cofactors.

Key words: placenta, folate-dependent metabolism, gene expression, metabolic modeling, homocysteine, *MTHFR* polymorphisms, purine synthesis, SAM & SAH.

Підписано до друку 23.08.2021 р. Формат 60x90¹/16
Ум. друк. арк. 0,9. Обл-вид. арк 0,9.
Наклад 100 прим. Замовлення №...
Віддруковано ...