

ОГЛЯДИ

УДК 618.56; 547.436; 543.544.5

ФОЛАТЗАЛЕЖНІ ПРОЦЕСИ У ПЛАЦЕНТІ ЛЮДИНИ: ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ, АМІНОТІОЛИ, ПРОЛІФЕРАЦІЯ І АПОПТОЗ

М. Ю. ОБОЛЕНСЬКА, Р. Р. РОДРИГЕС, О. П. МАРЦЕНЮК

*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ;
e-mail: m.obolenska@gmail.com*

У роботі наведено коротку інформацію про фолатзалежні процеси у клітині і про численні захворювання, які супроводжуються гіпергомоцистеїнемією. Детальніші відомості надаються щодо фолатзалежних процесів у плаценті людини, а саме щодо вмісту амінотіолів за різних алельних варіантів гена метилентетрагідрофолат-редуктази та фізіологічного перебігу вагітності і преєклампсії. Існуючі відомості щодо експресії і каталітичної активності відповідних ензимів систематизовано і доповнено власними результатами, які вперше засвідчили функціонування шляху транссульфування у плаценті людини. Цей шлях активується у плацентарних експлантах паралельно зі зниженням проліферації і підвищенням апоптозу за умов, які імітують гіпергомоцистеїнемію. Наведені дані вказують на важливість фолатзалежних процесів у плаценті для її нормального функціонування.

Ключові слова: плацента людини, фолатзалежні процеси, експресія генів, транссульфування, проліферація, апоптоз.

В останнє десятиріччя гомоцистеїн привертає особливу увагу біохіміків і клініцистів через остаточну невизначеність механізму його дії і через численність захворювань людини, які супроводжуються підвищеним рівнем гомоцистеїну у крові (гіпергомоцистеїнемією). У роботі надається коротка інформація про місце гомоцистеїну в метаболізмі клітини, про захворювання, які супроводжуються гіпергомоцистеїнемією, а також наводиться огляд результатів останніх років, одержаних у лабораторії системної біології Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ і в інших лабораторіях світу щодо метаболізму гомоцистеїну у плаценті людини, експресії відповідних ензимів і впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм, проліферацію і апоптоз в цьому органі.

1. Гомоцистеїн у фолатзалежних процесах

Гомоцистеїн – метаболіт, який знаходиться на перехресті метіонінового циклу і шляху транссульфування [1, 2]. Реакції метіонінового і фолатного циклів, транссульфування і пов'язаного з ним метаболізму глутатіону наведено на рис. 1. Вони обговорюються в багатьох оглядах [4–7]. Гомоцистеїн перетворюється на метіонін за участю метильної групи фолатів

(або бетаїну) і ензиму метіонінсинтази (MS, EC 2.1.1.13) або бетаїн-гомоцистеїн-метилтрансферази (BHMT, EC 2.1.1.5). Метіонін використовується в синтезі протеїнів і S-аденозилметіоніну (SAM). Останній утворюється за участю АТФ і метіонінаденозилтрансферази (EC 2.5.1.6) і є універсальним донором метильних груп у численних реакціях метилування, яких на разі ідентифіковано близько 400. До сполук, які метилуються, належать нейротрансмітери, фосфатидилхолін, фосфатидилсерин, протеїни, ДНК, РНК та інші. Через ці сполуки гомоцистеїн опосередковано пов'язаний із багатьма процесами в організмі, включаючи регуляцію експресії генів на різних її рівнях. У процесі реакції метилування SAM втрачає метильну групу і перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн, який гідролізується до гомоцистеїну. Тільки остання реакція метіонінового циклу може проходити у зворотному напрямку.

На шляху транссульфування гомоцистеїн перетворюється на цистеїн, який, у свою чергу, бере участь у синтезі протеїну, таурину, гідроген сульфату і глутатіону. На цьому шляху гомоцистеїн опосередковано пов'язаний із окисно-відновним станом клітини, процесами детоксикації і знову ж таки із біосинтезом протеїну. З метіоніновим циклом безпосеред-

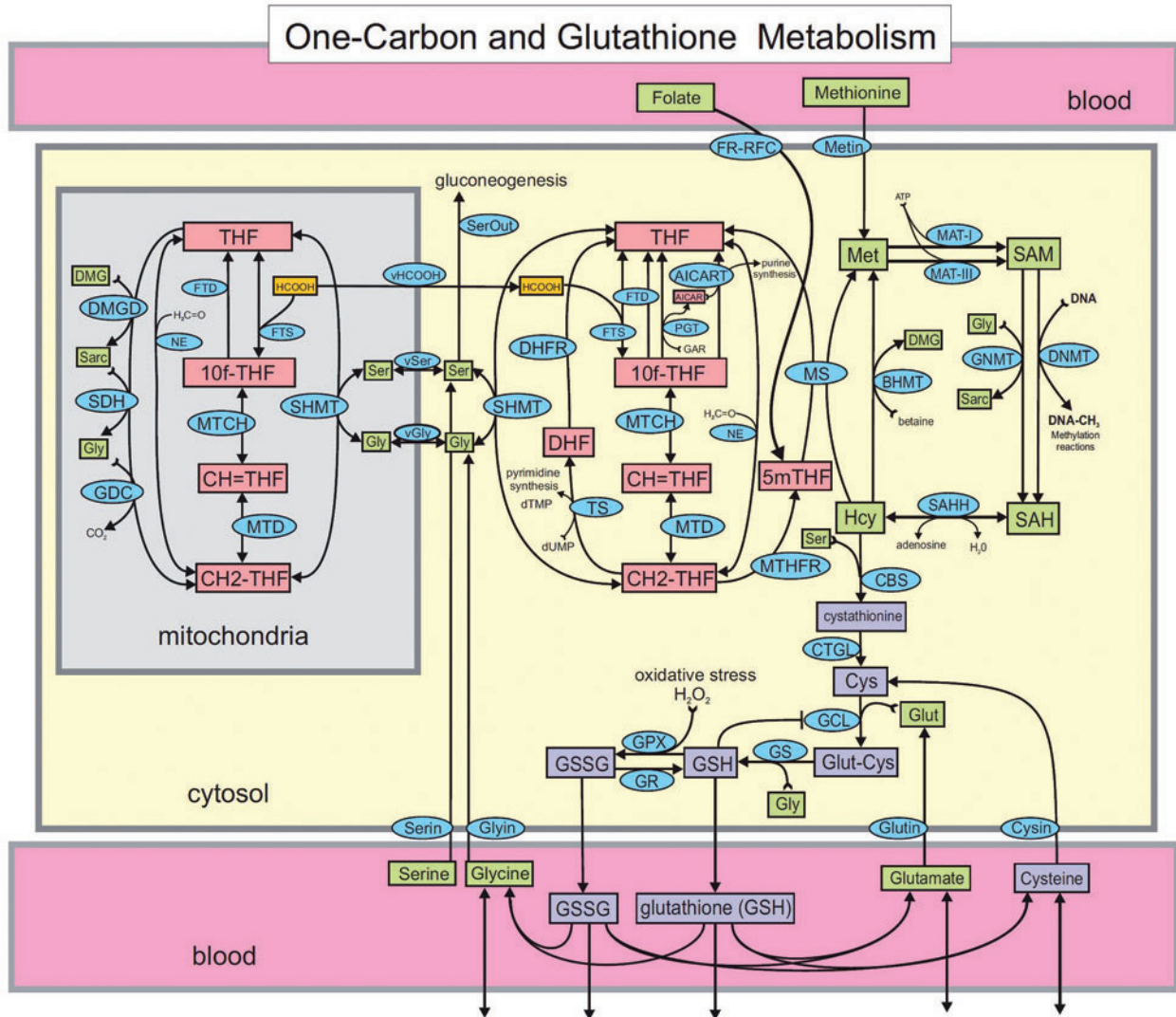


Рис. 1. Схема фолатзалежних процесів [3] (з люб'язного дозволу редакції журналу).

Ензими: MAT – метіонін-аденозилтрансфераза, GNMT – гліцин-N-метилтрансфераза, DNMT – ДНК-метилтрансфераза, SAHH – S-аденозилгомоцистеїн гідролаза, MS – метіонінсинтаза, BHMT – бетаїн-гомоцистеїн-метилтрансфераза, MTHFR – метилентетрагідрофолатредуктаза, DHFR – дигідрофолатредуктаза, MTD – метилентетрагідрофолат дегідрогеназа, MTCH – метенілтетрагідрофолат-циклогідролаза, FTS – формілтетрагідрофолат-синтетаза, FTD – формілтетрагідрофолат-дегідрогеназа, PGT – фосфорибозилгліцинамід-формілтрансфераза, AICART – фосфорибозиламіноімідазол-карбоксамід формілтрансфераза, TS – тимідилат синтаза, SHMT – серингідроксиметилтрансфераза, CBS – цистатіонін-β-синтаза, CTGL – цистатіонін-γ-ліаза, GCL – глутамат-цистеїн лігаза, GS – глутатіонсинтетаза, GPX – глутатіонпероксидаза, GR – глутатіонредуктаза, DMGD – диметилгліцин дегідрогеназа, SDH – саркозин дегідрогеназа, GDC – гліцин декарбоксілаза.

Транспортери, розташовані на зовнішньоклітинній мембрані клітин: FR-RFC – фолатний рецептор, Metin – метіоніновий, Glutin – глутаматний, Cysin – цистеїновий, Glycin – гліциновий, Serin – сериновий. **Мітохондріальні транспортери:** vHCOOH – форміатний, vSer – сериновий, vGly – гліциновий. **Метаболіти:** Met – метіонін, SAM – S-аденозилметіонін, SAH – S-аденозилгомоцистеїн, Hcy – гомоцистеїн, Gly – гліцин, Ser – серин, Sarc – саркозин, DMG – диметилгліцин, 5mTHF – 5-метилтетрагідрофолат, CH2THF – метилентетрагідрофолат, CHTHF – метенілтетрагідрофолат, 10fTHF – 10-формілтетрагідрофолат, GAR – гліцинамідрибонуклеотид, AICAR – P-рибозил-5-аміно-4-імідазол карбоксамід, THF – тетрагідрофолат, DHF – дигідрофолат, cystathionine – цистатіонін, Cys – цистеїн, Glut – глутамат, Glut-Cys – глутамілцистеїн, GSH – глутатіон, GSSG – глутатіондисульфід

ньо пов'язаний фолатний цикл, який постачає одновуглецеві фрагменти до метіонінового циклу і синтезу попередників нуклеїнових кислот, пуринів і піримідинів, а відтак фолатний цикл пов'язаний із проліферацією і експресією генів. Таким чином, обидва цикли є вкрай необхідними для нормальної життєдіяльності клітини.

З огляду на зв'язок обох циклів із життєво важливими процесами у клітині не дивно, що порушення в цих циклах супроводжують численні захворювання (рис. 2). Показником функціональної активності обох циклів вважається рівень гомоцистеїну, який найчастіше визначають у сироватці або плазмі крові, але який наразі не завжди розглядається як патогенетичний фактор. Гіпергомоцистеїнемія спостерігається при інфарктах, інсультах, атеросклерозі, тромбозах [8–11], розладах нервової системи (хворобі Альцгеймера, вікових дегенеративних змінах, депресіях, психічних розладах, аутизмі та ін.) [12–15]. Протиріччя існують щодо ролі гомоцистеїну і фолатзалежних процесів у канцерогенезі від визнання [16] до невизнання їхньої ролі в патогенезі хвороби різної локалізації [17, 18].

У контексті огляду особливу увагу приділено патологіям вагітності. Серед них чинне місце займає преєклампсія, яка характеризується високим артеріальним тиском, протеїнурією і небезпечна через високу смертність матері і дитини. У світі вона зустрічається приблизно у 5% вагітних. Плацентарна недостатність, відторгнення плаценти, спонтанні аборти, вроджені вади розвитку плода і, вірогідно, внутрішньоутробна затримка росту плода і навіть внутрішньоутробна смерть доповнюють перелік ускладнень вагітності, які можуть супроводжуватися гіпергомоцистеїнемією [19–22]. В Інституті нейрохірургії АМН України (Київ) щорічно оперують до 100 немовлят із *Spina bifida* (незарощенням нервової трубки) [23]. Згідно з даними літератури частота вроджених вад нервової системи у живонароджених в Україні складає близько 1,39 на 1000. Серед них за 1999–2003 рр. в Київській області середня частота аненцефалій становила 0,3, а розщипин хребта – 0,6 на 1000 [24, 25]. Більшість таких дітей помирає на першому році життя.

У патогенезі захворювань вагітності суттєву роль стали приділяти плацентарному метаболізму. Адже плацента не тільки

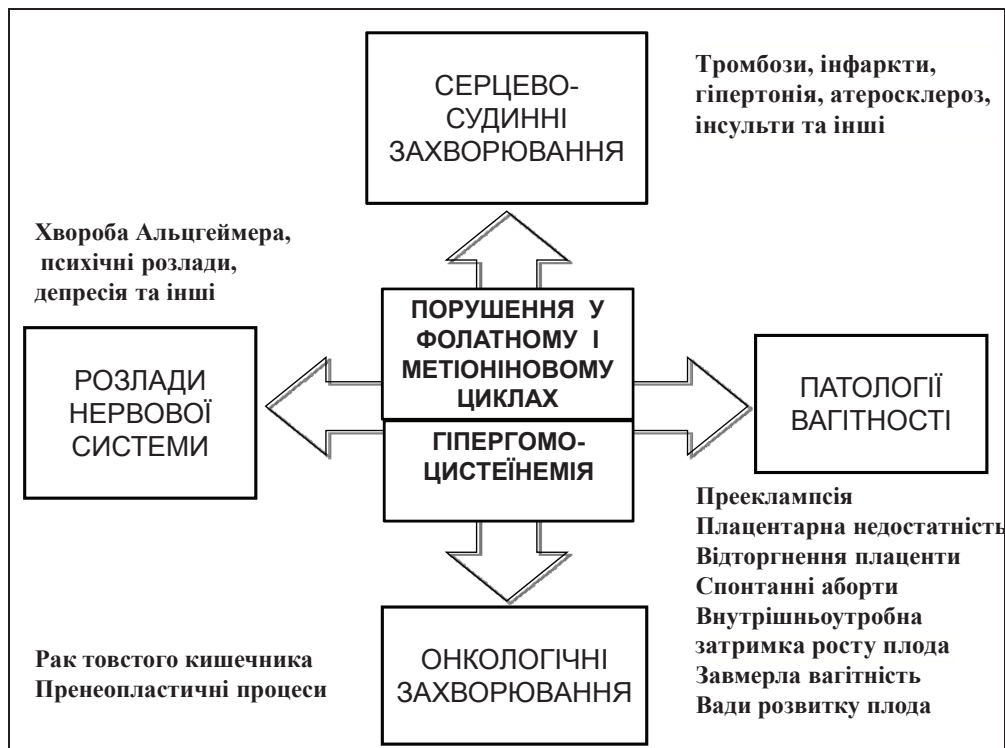


Рис. 2. Захворювання, що супроводжуються гіпергомоцистеїнемією (схему створено на підставі публікацій [7–22])

транспортує поживні речовини від матері до плода і продукти метаболізму від плода до матері, але й активно метаболізує їх. Таким чином, нагальне питання, яке постає в наш час, — це з'ясувати як гомоцистеїн метаболізується у плаценті людини і як гіпергомоцистеїнемія впливає на метаболізм, проліферацію і апоптоз у цьому органі.

2. Метаболізм гомоцистеїну у плаценті людини

Вміст гомоцистеїну і його перетворення в будь-якій тканині залежать від декількох факторів: концентрації гомоцистеїну у крові і його надходження у тканину; концентрації супутніх речовин, необхідних для функціонування фолатзалежних процесів (вітаміни B_6 , B_{12} , B_2 , фолати); роботи специфічних транспортних систем; генотипу організму (або тканини в разі плаценти), адже численні ензими фолатзалежних процесів є поліморфними, і ізоформи їх виявляють різну каталітичну активність; а також від тканинспецифічних особливостей фолатзалежних процесів. Незважаючи на вагомий роль плаценти у фізіології і патології вагітності, всі ці фактори є мало дослідженими.

Нещодавно показано, що транспортери нейтральних амінокислот систем L, A, u+L переносять гомоцистеїн через мікроворсинчасту мембрану плаценти [26]. Подальша участь гомоцистеїну у плаценті остаточно не визначена — чи він у незміненому вигляді переноситься до плода, чи метаболізується у плаценті. Відомо, що концентрація гомоцистеїну у крові матері вища за концентрацію у венозній пуповинній крові, і що концентрації в цих двох середовищах значно корелюють між собою [27]. У плаценті людини виявлено експресію багатьох ензимів метіонінового і фолатного циклів, хоча часто бракує повних даних щодо експресії відповідних генів на рівні РНК та протеїну і активності ензимів, а для багатьох ензимів, особливо це стосується мітохондріальних ензимів, відомості щодо експресії їх поки що відсутні (табл. 1). Дані, зведені в табл. 1, у порівнянні з рис. 1 наочно демонструють прогалини в наших знаннях і є підставою для планування майбутніх досліджень. Ці дані засвідчують також наявність у плаценті людини тканинспецифічних особливостей експресії генів, які задіяні в метіоніновому і фолатному циклах. Фолатзалежні процеси найбільш вивчені в печінці еукаріот [5]. Однак, якщо в печінці ензим метіонін-аденозилтрансфераза наявний у двох ізоформ — MAT I і MAT III

[29], то у плаценті присутня тільки ізоформа II цього ензиму [28]. Її кінетичні характеристики ($K_m = 0,015$ мМ для метіоніну) значно відрізняються від кінетичних характеристик ізоформи III ($K_m = 0,3$ мМ для метіоніну) й ізоформи I ($K_m = 0,041$ мМ для метіоніну) [51]. У плаценті не експресуються гени, які кодуєть гліцин N-метилтрансферазу (GNMT, EC 2.1.1.20) [30] та бетаїн-гомоцистеїн-метилтрансферазу [37]. Це дає привід очікувати меншу здатність плаценти до утилізації великої кількості метіоніну та гомоцистеїну порівняно з печінкою. Адже в печінці саме ці ензими активно задіяні за метіонінового навантаження [52]. Крім того, у плаценті не експресується ген, який кодує 10-формілтетрагідрофолат дегідрогеназу (FTD, EC 1.5.1.6), що відповідає за відновлення 10-формілтетрагідрофолату до тетрагідрофолату і окису вуглецю і негативно регулює проліферацію [40].

За дослідження ролі фолатзалежних процесів впродовж вагітності їхні метаболіти традиційно визначали у крові матері і в пуповинній крові новонародженого. Безпосередньому вивченню процесів у плаценті були присвячені дослідження, які впродовж останніх років проводили в лабораторії системної біології Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Результати цих робіт опубліковано у вітчизняній періодиці [44, 55] і є складовою частиною цього огляду. Одним із завдань дослідження було з'ясувати питання, чи існує асоціація між генотипом плаценти, який відповідає генотипу плода (за виключенням децидуальної частини плаценти), і вмістом компонентів метіонінового циклу і реакцій, пов'язаних з ними. Реметилування гомоцистеїну істотно залежить від ензиму метилентетрагідрофолат-редуктази (MTHFR, EC 1.5.1.20), який відновлює 5',10'-метилентетрагідрофолат у 5'-метилтетрагідрофолат. Останній передає свою метильну групу гомоцистеїну в реакції його реметилування. Ензим метилентетрагідрофолат-редуктаза є поліморфним. Найчастіше, майже у 50% білого населення Європи, зустрічається поліморфізм у 677-му положенні гена [53]. У разі знаходження двох цитозинів у цьому положенні активність ензиму є максимальною, у разі наявності тимідину в одному із алелей активність ензиму складає 65%, а у двох алелях — лише 30% від максимального значення [54]. У 68 зразків зрілої плаценти, із яких 40 було взято після фізіологічного перебігу вагітності, а 28 — після прееклампсії, визначали генотип гена метилентетрагідрофолат-редуктази. Виявилось, що умовно «нормаль-

Таблиця 1. Дані щодо експресії і активності ензимів фолатзалежних процесів у плаценті людини

Ензим	РНК	Протеїн	Ензиматична активність	Посилання
MAT II	+	Д.н.	Д.н.	28
MAT I і MATIII	–	Д.н.	Д.н.	29
GNMT	–	Д.н.	Д.н.	30
GATM	+	Д.н.	Д.н.	31
DNMT		Д.н.	+	32
SAMDC	Д.н.	+	+	33
SAHH	Д.н.	+	+	34
MS	+	+	+	35, 36
BHMT	–	Д.н.	Д.н.	36
MTHFR	+	Д.н.	Д.н.	35
DHFR	Д.н.	+	+	38
MTD,MTCH,FTS	+	Д.н.	Д.н.	39
FTD	–	Д.н.	Д.н.	40
AICART	+	Д.н.	Д.н.	41
TS	+	Д.н.	Д.н.	42
SHMT	Д.н.	Д.н.	+	43
CBS	+	+	+	35, 44
CTGL	Д.н.	+	Д.н.	45
GCL	+	+	+	46
GS	Д.н.	Д.н.	+	47
GPX	+	+	Д.н.	48
GR	Д.н.	Д.н.	+	49
mMTD, mMTCH, mFTS	+	Д.н.	Д.н.	39
mGDC	+	Д.н.	Д.н.	50

Примітка: Аббревіатури ензимів див. у підпису до рис. 1. SAMDC – S-аденозил-метіонін декарбоксілаза; GATM – гуанідинацетат N-метилтрансфераза. Мітохондріальні ензими позначені латинською літерою «m», «+» і «–» позначено наявність і відсутність відповідного показника; Д.н. – даних немає

ний» С/С генотип зустрічається в 52,5% зразків у групі з фізіологічним перебігом вагітності і 42,8% у групі із преєклампсією. Гетерозиготи зустрічаються майже з однаковою частотою у двох групах (39,3 і 42,5%). У той самий час мутовані Т/Т гомозиготи зустрічаються значно частіше у групі із преєклампсією, ніж у групі із фізіологічним перебігом вагітності (17,8 проти 5,0%) [55].

У цих самих зразках було визначено загальний вміст фолатів, гомоцистеїну та метіоніну, і результати розподілено згідно з характером перебігу вагітності і алельними варіантами гена *MTHFR*. У разі збігу декількох факторів – найнижчого вмісту фолатів, носійства С/Т генотипу і на фоні преєклампсії – рівень гомоцистеїну був найви-

щим, а рівень метіоніну найнижчим серед всіх показників за різних комбінацій перелічених факторів (гомоцистеїн: 0,14 (0,06–0,16) проти 0,09 (0,05–0,19) нмоль/мг протеїну; фолати: 0,2 (0,1–0,4) проти 0,4 (0,2–0,6) мкг/мг протеїну; метіонін: 3,7 (0,4–5,0) проти 5,5 (3,1–10,6) нмоль/мг протеїну). [55]. Одержані дані засвідчили, що рівень гомоцистеїну у плаценті негативно асоційований з рівнем фолатів в органі і залежить також від фенотипових особливостей тканини (в цьому разі характерних для преєклампсії) і від генотипу метилентетрагідрофолат-редуктази [55].

Вміст гомоцистеїну у плаценті залежить і від того, як він метаболізується в органі. Справа в тому, що метіоніновий цикл притаманний всім клітинам організму, що опосередко-

вано підтверджується експресією відповідних генів у плаценті (табл. 1). Переконливі докази функціонування шляху транссульфування (перетворення гомоцистеїну в цистеїн) до цього часу існували тільки для печінки, нирок, підшлункової залози і слизової оболонки тонкого кишечника [56]. Стосовно плаценти існувало тільки припущення щодо його функціонування в цьому органі [35, 45]. Детальніше етапи транссульфування і подальшого синтезу таурину за участю відповідних ензимів наведено на рис. 3. За допомогою реакцій зворотної транскрипції і ланцюгової полімеризації ми вперше довели, що гени, які кодують цистатіонін- β -синтазу (CBS, EC 4.2.1.22) [55] та цистатіонін- γ -ліаза (CGL, EC 4.4.1.1), цистеїн-діоксигеназу (CDO, EC 1.13.11.20) і цистеїнсульфінат-декарбоксілазу (CSD, EC 4.1.1.29; дані не опубліковано) експресуються на рівні РНК у плаценті людини і у клітинах BeWo, що походять із трофобласту хоріокарциноми людини.

На сьогодні детальніше досліджено експресію гена, який кодує перший ензим на шляху транссульфування гомоцистеїну – цистатіонін- β -синтазу. Крім специфічної РНК у зразках першого і третього триместрів вагітності, було виявлено і протеїни за допомогою специфічних антитіл [55]. Ензим локалізується в синцитіотрофобласті, і за допомогою радіоактивно міченого попередника в синтезі цистатіоніну – серину – вперше доведено, що цей ензим є каталітично активним у плаценті [55]. Таким чином, транс-

сульфування у плаценті відбувається, хоча і зі значно меншою інтенсивністю, ніж у печінці ($3,2 \text{ мОд} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ загального протеїну цитозолу проти $53 \text{ мОд} \cdot \text{год}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$) [56, 58].

3. Вплив гіпергомоцистеїнемії на метаболізм, проліферацію і апоптоз у плаценті людини

Оскільки численні ускладнення вагітності супроводжуються гіпергомоцистеїнемією, то виникає питання, як вона впливає на метаболізм, проліферацію і апоптоз у плаценті. На сьогодні відомі публікації двох дослідницьких груп, які працювали з первинною культурою цитотрофобластів і довели, що підвищені концентрації гомоцистеїну ($10\text{--}40 \text{ мкМ}$) і гомоцистеїн-тіолактону ($10\text{--}400 \text{ мкМ}$) спричинюють апоптоз у цих клітинах [59, 60]. На відміну від зазначених вище досліджень ми використали плацентарні експланти першого і третього триместрів вагітності, які за своїми характеристиками є наближенішими до ситуації *in vivo*, ніж первинна культура трофобластів. Експланти культивували за стандартних умов і у присутності зростаючої концентрації гомоцистеїну – 20, 40 і 80 мкМ. Ці концентрації відповідають тим, які зустрічаються у клініці за ускладнень вагітності. Впродовж вагітності концентрація гомоцистеїну у плазмі і сироватці крові із статистичною вірогідністю нижча за відповідну величину в невагітних жінок такого самого віку [61], однак у разі ускладнень вагітності, зокрема преєклампсії, повторних зривів вагітності

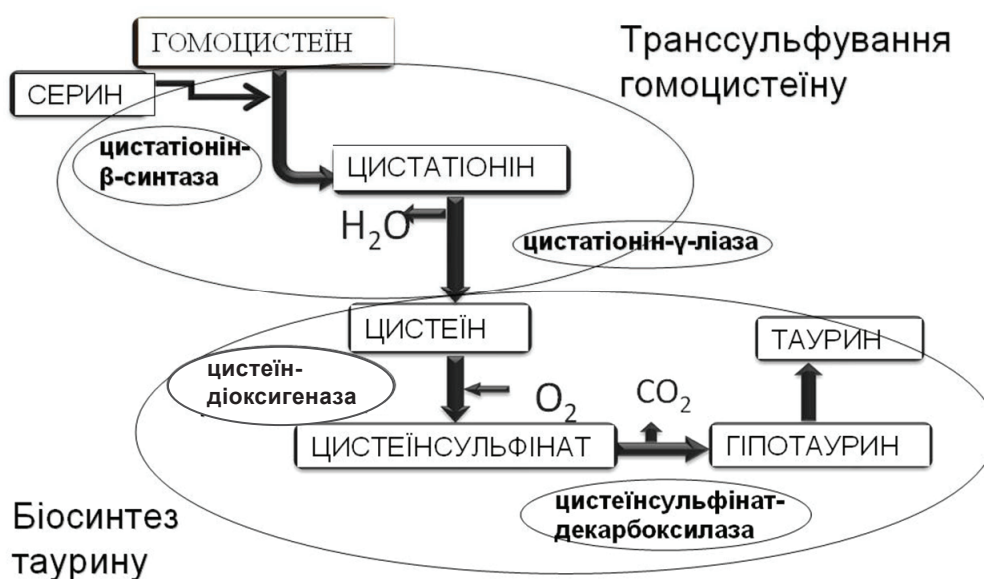


Рис. 3. Схема біосинтезу таурину (адаптовано з [5])

та жіночої стерильності невизначеної етіології, вона сягає 20–30 мкМ концентрації проти 5–11 мкМ в контрольній групі вагітних і навіть перевищує 50 мкМ концентрацію після навантаження метіоніном [21, 62].

Наші дослідження показали, що у присутності в культуральному середовищі від 20 до 80 мкМ концентрації гомоцистеїну в експлантах підвищується вміст протеїну цистатіонін – β-синтази [44]. Одночасно зростає і вміст цистеїну, тобто найвірогідніше, що гомоцистеїн, який потрапляє у клітини експлантів, частково використовується для синтезу цистеїну шляхом транссульфування (табл. 2) [44].

Впродовж всього періоду функціонування плаценти особливо важливим є співвідношення між проліферацією (адже маса органа поступово збільшується) і апоптозом, які відбуваються паралельно. Варто зазначити, що близько 16 нг наночастинок синцитіотрофобласта, які є апоптотичним матеріалом, визначають в 1 мл венозної крові матері. Цей матеріал сягає декількох грамів щодобово і елімінується із кровообігу матері шляхом фагоцитозу [63]. Із підвищенням концентрації гомоцистеїну в середовищі, де культивуються експланти, проліферативний індекс у них знижується, а

апоптотичний – підвищується, і зміни апоптотичного індексу відбуваються швидше за зміни проліферативного (табл. 2) [44]. Найвища застосована концентрація гомоцистеїну (80 мкМ) в культуральному середовищі призводить до грубих порушень структури ворсинки – відшарування синцитіотрофобласта від трофобласта [44].

4. Ймовірний механізм дії гомоцистеїну

Нез'ясованим залишається питання щодо механізму дії гомоцистеїну. Дослідження із плацентарними експлантами показало, що інкубація їх з гомоцистеїном призводить до активації шляху транссульфування і, отже, до активації синтезу цистеїну. Серед усіх амінотіолів у плаценті людини цистеїн складає близько 63%, глутатіон – 19,7%, метіонін – 17% і гомоцистеїн – 0,4% (табл.3) [55]. 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 [64].

Вміст гомоцистеїну і цистеїну у клітині строго контролюється. Вміст останнього має

Таблиця 2. Проліферативний і апоптотичний індекси, вміст протеїну CBS і цистеїну в експлантах плаценти першого триместру вагітності [44]

Умови культивування, мкМ ГЦ	Проліферативний індекс		Апоптотичний індекс		Вміст протеїну CBS	Вміст цистеїну
	Абсолютна од.	Відносна од.	Абсолютна од.	Відносна од.	Відносна од.	Відносна од.
0	4,2 (3,1–5,1)	1	0,8 (0,1–1,1)	1	1	1
20	2,2* (1,0–3,2)	0,6	2,0* (1,7–3,2)	2,5	3,3	4
40	1,5* (1,1–2,3)	0,4	4,2* (2,2–6,2)	5,3	1,5	15
80	1,5* (1,2–2,2)	0,4	5,4* (4,1–6,7)*	6,8	2,0	10

Проліферативний індекс відображає кількість Ki67 позитивних клітин на 100 мкм окружності ворсинки хоріона і наведений у вигляді медіан абсолютних і відносних значень. У дужках наведено квартилі абсолютних значень. Апоптотичний індекс відображає частину площі у відсотках, яку займає M30 CytoDEATH – позитивна зафарбованість у ворсинці хоріона в загальній площі зрізу ворсинки, і наведений у вигляді медіан абсолютних і відносних значень. У дужках наведено квартилі абсолютних значень. * Значення індексів відрізняються від відповідних значень за стандартних умов культивування без ГЦ із статистичною вірогідністю (тест Вілкоксона, $P < 0,05$). Вміст протеїну CBS визначений методом вестерн-блот аналізу, вміст цистеїну – рідинною хроматографією високого тиску з електрохімічною детекцією. Методичні подробиці подано в оригінальних роботах [44,55]

Таблиця 3. Концентрація фолатів і амінотіолів у зрілій плаценті людини

Фолати	Гомоцистеїн	Метіонін	Цистеїн	Глутатіон
0,4	0,09	5,5	21,3	6,8
(0,20–0,60)	(0,05–0,19)	(3,10–10,60)	(16,54–26,69)	(2,60–13,31)

Концентрацію фолатів наведено в мкг/мг протеїну, концентрацію амінотіолів – в нмоль/мг протеїну. Всі показники наведено у вигляді медіанних значень і квартилей (в дужках)

бути достатньо високим, щоб задовольнити всі клітинні потреби. Цистеїн, як й інші амінокислоти, використовується для синтезу протеїнів. Він також є попередником синтезу глутатіону, гіпотаурину, таурину, неорганічного сульфату і гідроген сульфіді. Його сульфгідрильна група є реакційною групою коензиму А, який необхідний для численних реакцій ацилювання. Вона задіяна також у багатьох реакціях відновлення. З іншого боку, вміст цистеїну у клітині не має перевищувати його порога цитотоксичності. Адже він радше за гомоцистеїн здатний до автоокислення за наявності солей металів змінної валентності [65], що призводить до появи вільних радикалів, які в певній концентрації стають причиною апоптозу. Хвороби Паркінсона, Альцгеймера [14] і деякі ускладнення вагітності [66] асоціюють із хронічно підвищеним вмістом цистеїну у крові. На цьому етапі досліджень фолатзалежного метаболізму у плаценті людини припускаємо, що автоокислення цистеїну може бути одним із декількох чинників, які сприяють апоптозу в умовах культивування, що імітують гіпергомоцистеїнемію. Вельми ймовірно, що *in vivo* в умовах підвищеної концентрації гомоцистеїну у тканині плаценти на фоні зниженого рівня фолатів, С/Т генотипу гена метилентетрагідрофолат-редуктази і преекламсії відбувається аналогічний процес. Не можна виключити і токсичної дії самого гомоцистеїну, який теж здатний до автоокислення, але меншою мірою, ніж цистеїн, з утворенням активних радикалів кисню і пероксинітрити [4, 67]. 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 [59,60].

Оскільки між фолатзалежними процесами існує тісна взаєморегуляція [3], то стає очевидним, що зміни в концентрації одного або декількох метаболітів призводять до широкомасштабніших змін в усій системі фолатзалежних процесів. Для того, щоб

перевірити як впливають деякі особливості плацентарного фолатзалежного метаболізму на ці процеси в цілому, ми скористалися математичною моделлю фолатзалежних процесів, програму користування якою нам люб'язно надали автори розробки [3]. Модель включає всі реакції, які авторами розробки наведено на рис. 1. Модель описує фолатзалежні процеси в узагальненому вигляді, оскільки автори використовували наявні показники концентрації метаболітів і кінетичні характеристики ензимів як для печінки, адже в цьому органі вони вивчені найповніше, так і для клітинних ліній гепатоцитів людини й інших тварин. У моделі враховано взаєморегуляцію між компонентами фолатзалежних процесів і їхню внутрішньоклітинну компартменталізацію, обмін метаболітами між кров'ю і тканиною, інгібування фолатами ензимів, задіяних у фолатзалежних процесах. Суттєвим є те, що автори, створюючи модель, передбачили існування активного клітинного поділу, і, відповідно, активного синтезу попередників нуклеїнових кислот, що є важливим для використання моделі з метою аналізу фолатзалежних процесів у плаценті. Як кожна модель, вона дає можливість цілеспрямовано змінювати деякі параметри і аналізувати наслідки цих змін в різних ділянках системи, що може бути дороговказом для наступних експериментальних досліджень, і, як кожна модель, вона безумовно має обмеження. Автори моделі використовують у своїй розробці дві величини – концентрацію метаболітів (мкМ) і швидкість реакції (мкмоль/год).

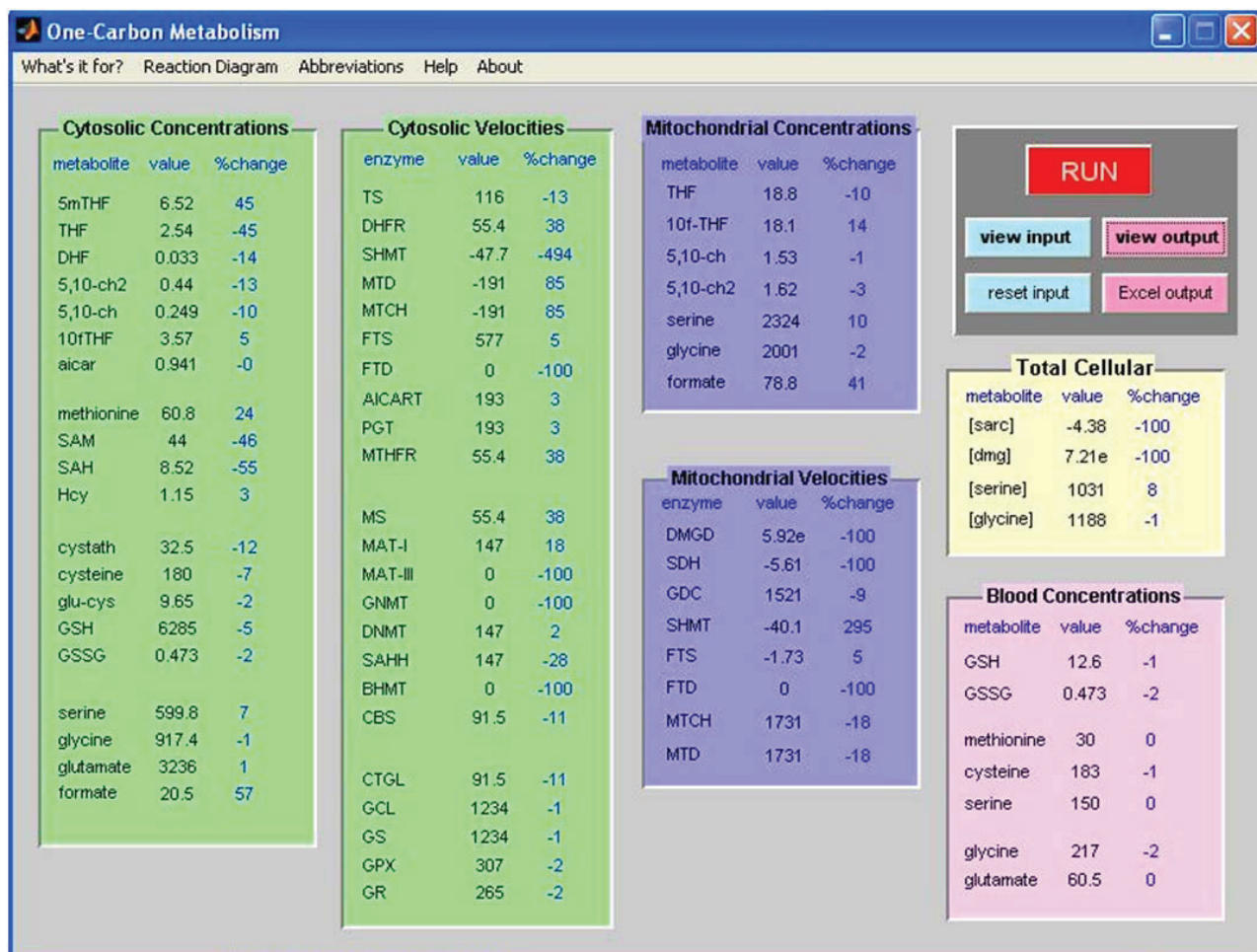
Враховуючи відсутність деяких ензимів фолатзалежних процесів у плаценті людини порівняно з печінкою (метіонін-аденозилтрансфераза III, гліцин-N-метилтрансфераза, бетаїн-гомоцистеїн-метилтрансфераза і 10-форміл-тетрагідрофолат дегідрогеназа, див. табл. 1) і відповідних метаболічних шляхів, модель було змінено і проаналізовано наслідки цих змін в усій системі процесів (табл. 4). Модель перераховує швидкість і концентрації метаболітів і надає абсолютні величини цих параметрів

та їх зміни у відсотках по відношенню до відповідних показників до зміни моделі. Аналіз проведено тільки за показниками у відсотках. У цитозолі це позначилося на підвищенні вмісту 5'-метилтетрагідрофолату, метіоніну і швидкості реакції, каталізованої метіонінсинтазою, але позначилося на зниженні вмісту SAM і SAH. Реакція, яку каталізує серингідроксиметилтрансфераза (SHMT, EC 2.1.2.1) в цитозолі, в цьому разі перебігає в напрямку гліцин → серин. Зріс вміст форміату, який є субстратом за утворення 10'-формілтетрагідрофолату – донора одновуглецевих фрагментів для синтезу пуринового кільця. Майже незмінними залишилися швидкості реакцій постачання одновуглецевих фрагментів від 10-формілтетрагідрофолату і 5',10'-метенілтетрагідрофолату для синтезу пуринового кільця, які каталізуються

фосфорибозилгліцинамід-формілтрансферазою (PGT, EC 2.1.2.2) і фосфорибозиламіно-імідазолкарбоксиамід формілтрансферазою (AICART, EC 2.1.2.3). Незначних змін зазнали вміст метилентетрагідрофолату – субстрату для тимідилат синтази (ТС, EC 2.1.1.45) – і швидкість утворення тимідилату. Тобто синтез попередників нуклеїнових кислот, який є пріоритетним для плаценти, залишився незмінним після модифікації моделі. Навпаки, процеси метилування за введених модифікацій стали відбуватися повільніше.

У мітохондріях істотно знизилися швидкості реакцій утворення метилентетрагідрофолату в реакціях, які каталізують диметилгліцин дегідрогеназа (DMGD, EC 1.5.99.2) і саркозин дегідрогеназа (SDH, EC 1.5.99.1). Найімовірніше це пов'язано з тим, що ензим бетаїн-гомоцистеїн-метилтрансфераза,

Таблиця 4. Симуляція фолатзалежних процесів через «відключення» ензимів, які не експресуються у плаценті людини



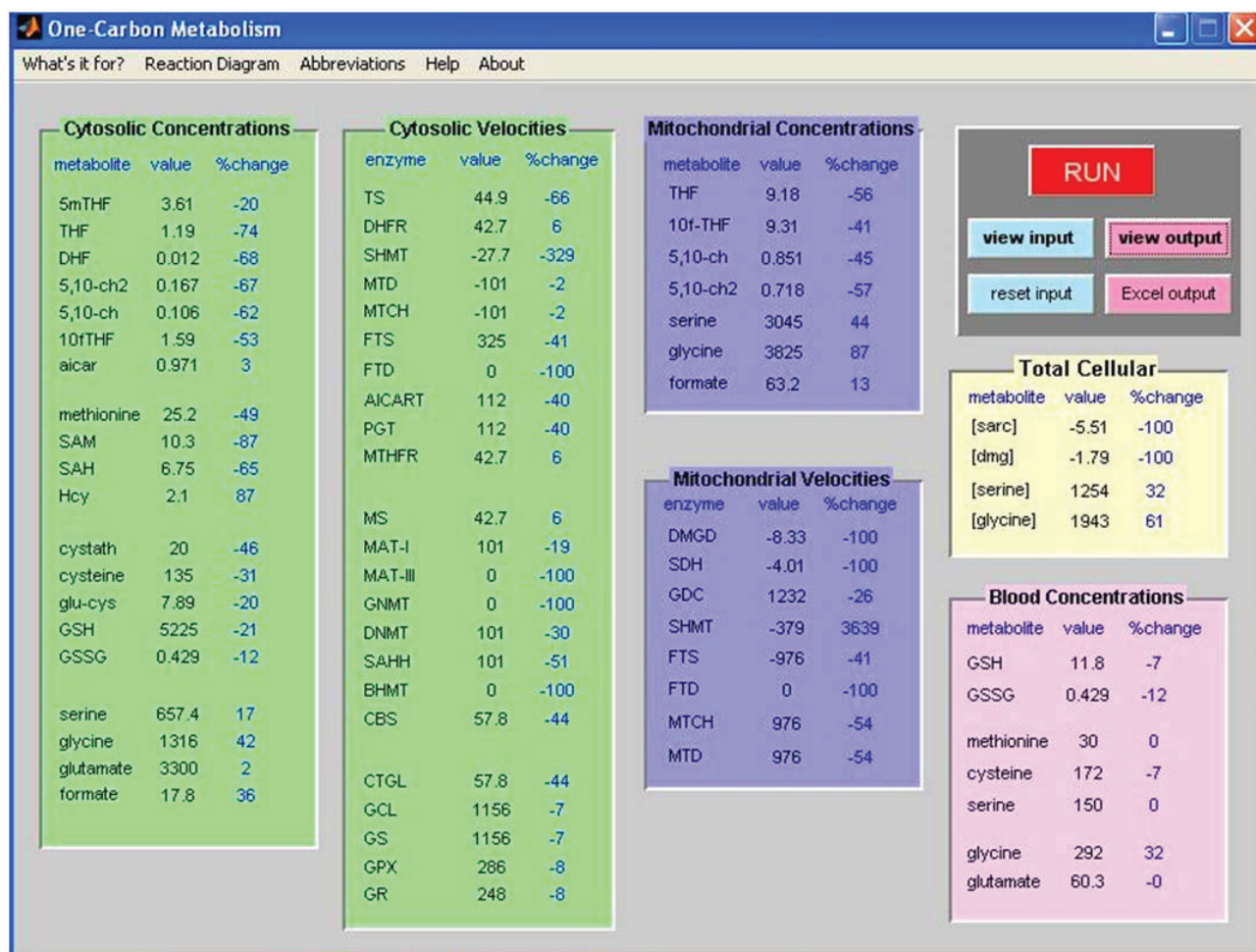
Тут і в табл. 5: абрєвіатури ензимів і метаболітів див. у підпису до рис. 1. Концентрації метаболітів подано в мкМ, швидкість ензиматичних реакцій в мкмоль · год⁻¹

який постачає субстрати для цих реакцій, не експресується у плаценті людини. На жаль, у доступній нам літературі не вдалося виявити даних про функціонування диметилгліцин дегідрогенази і саркозин дегідрогенази у плаценті людини, що є підставою для подальшого експериментального з'ясування цього питання. Істотно підвищилася швидкість утворення метилентетрагідрофолату, яке каталізує мітохондріальна серингідроксиметилтрансфераза, що може забезпечувати синтез метилентетрагідрофолату на належному рівні за ймовірної відсутності диметилгліцин дегідрогенази і саркозин дегідрогенази (табл. 4).

Наступні зміни, що їх було внесено нами у модель, відповідали тим, які було одержано за дослідження зразків плаценти із С/Т генотипом метилентетрагідрофолат-редуктази

від породіль із прееклампсією, а саме приблизно у два рази зменшили вміст фолатів і метіоніну та знизили до 65% швидкість реакції, каталізованої метилентетрагідрофолат-редуктазою (табл. 5). У цьому разі модель показала істотне підвищення рівня гомоцистеїну на 87%, що відповідає результатам, одержаним в експерименті [55]. Крім того, ще виразніше зменшився вміст SAM і SAH, фолатів всіх форм як у цитозолі, так і в мітохондріях, і значно зменшилася швидкість реакцій, які задіяні в синтезі попередників нуклеїнових кислот за участю тимідилат синтази, фосфорибозил-гліцинамід-формілтрансферази, і фосфорибозил-аміно-імідазолкарбоксамід форміл-трансферази. Останній результат збігається з експериментальними даними щодо зниження проліферативного індексу у плацен-

Таблиця 5. Симуляція фолатзалежних процесів у плаценті С/Т генотипу метилентетрагідрофолат-редуктази, меншого вмісту фолатів і метіоніну та «відключення» ензимів, які не експресуються у плаценті людини



тарних експлантах, культивованих в умовах, які імітують гіпергомоцистеїнемію [55]. Катастрофічно зросла швидкість реакції утворення метилентетрагідрофолату за участю мітохондріальної серингідроксиметилтрансферази, яка, функціонуючи в напрямку серин → гліцин, однак виявилася не у змозі підтримати належний рівень формілтетрагідрофолату і форміату. Адже мітохондрії є основним постачальником форміату в цитоплазму для подальшого використання його вуглецю для синтезу пуринового кільця.

Проведений аналіз із використанням математичної моделі безперечно має обмеження. Цей аналіз ні в якому разі не доводить, що саме такі тканиноспецифічні особливості фолатзалежних процесів притаманні плаценті людини і що вони, таким чином, змінюються за умов певного генотипу метилентетрагідрофолат-редуктази, меншого вмісту фолатів і підвищеного рівня гомоцистеїну. В той самий час результати аналізу дають деяку підставу для наступного цілеспрямованішого експериментального дослідження і, зокрема, експресії/активності ензимів, задіяних у синтезі попередників нуклеїнових кислот, реакціях метилування, визначенні вмісту і розподілу різних форм фолатів між компартментами клітини тощо.

5. Перспективи експериментальних досліджень

Огляд існуючих даних щодо фолатзалежних процесів у плаценті людини висвітлює прогалини в наших знаннях відносно експресії генів і каталітичної активності їхніх продуктів, механізмів зниження проліферативної активності і підвищення апоптозу, кореляції між процесами метилування і синтезом попередників нуклеїнових кислот, чутливості фолатзалежних процесів до змін у надходженні субстратів, оксидативного стресу та багато інших. Вирішення цих питань видається важливим для розкриття значення фолатзалежних процесів у функціонуванні плаценти й їхній ролі в розвитку патологій вагітності.

Автори щиро вдячні професорові К. Ульріх (С.М. Ulrich, Fred Hutchinson Cancer Research Center) за надання програми для математичного моделювання.

ФОЛАТЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЛАЦЕНТЕ ЧЕЛОВЕКА: ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, АМИНОТИОЛЫ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ И АПОПТОЗ

М. Ю. Оболенская, Р. Р. Родригес, О. П. Марценюк

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;
e-mail: m.obolenska@gmail.com

В работе приводится краткая информация о роли фолатзависимых процессов в биохимии клетки, о многочисленных заболеваниях, которые сопровождаются гипергомоцистеинемией. Более детально освещаются вопросы, связанные с фолатзависимым метаболизмом в плаценте человека. Приводятся данные о содержании аминотиолов при разных аллельных вариантах гена метилентетрагидрофолат-редуктазы во время физиологического протекания беременности и при преэклампсии. Существующие данные относительно экспрессии и каталитической активности соответствующих ферментов дополнены собственными данными авторов, которые засвидетельствовали функционирование пути транссульфирования в плаценте человека. Этот путь активируется в плацентарных эксплантах параллельно со снижением пролиферативной активности и повышением апоптоза в условиях, которые иммитируют гипергомоцистеинемию. В целом приведенные в обзоре данные свидетельствуют о важной роли фолатзависимых процессов в плаценте человека для нормального функционирования этого органа.

Ключевые слова: плацента человека, фолатзависимые процессы, экспрессия генов, транссульфирование, пролиферация, апоптоз.

FOLATE-RELATED PROCESSES IN HUMAN PLACENTA: GENE EXPRESSION, AMINOTHIOLS, PROLIFERATION AND APOPTOSIS

*M. Yu. Obolenskaya, R. R. Rodrigues,
O. P. Martsenyuk*

Institute of Molecular Biology and Genetic,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: m.obolenska@gmail.com

Summary

The paper contains short information concerning the role of folate-related processes in cell metabolism and multiple diseases which are characterized by hyperhomocysteinemia. The authors represent more detailed information about the folate-related processes in human placenta, namely about the content of aminothiols at different allelic variants of placental methylenetetrahydrofolate reductase during the course of physiological pregnancy and preeclampsia. The existing data concerning the expression and catalytic activity of corresponding enzymes are corroborated by the authors' own results that proved for the first time the functional activity of transsulfuration pathway in human placenta. This pathway is activated in placental explants in parallel with down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis when hyperhomocysteinemia is imitated by high concentration of homocysteine in culture medium. On the whole the presented data point to the importance of placental folate-related processes for its normal function.

Key words: human placenta, folate-related processes, gene expression, transsulfuration, proliferation, apoptosis.

- Mudd S. H., Matorin A. I., Levy H. L. // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. – 1989. – 63, N 2. – P. 297–300.*
- Tarver H., Schmidt CLA. // J. Biol. Chem. – 1939. – 130, N 1. – P. 67–80.*
- Reed M. C., Thomas R. L., Pavisic J. et al. // Theor. Biol. Med. Model. – 2008. – 28, N 5. – P. 8.*
- Пентюк О. О., Луцюк М. Б., Андрушко І. І., Постовітенко К. П. // Укр. біохім. журн. – 2003. – 75, № 1. – P. 5–17.*
- Stipanuk M. H. // Annu Rev. Nutr. – 2004. – 24. – P. 539–77.*
- Fox J. T., Stover P. J. // Vitam. Horm. – 2008. – 79. – P. 1–44.*
- Tibbets A. S., Appling D. R. // Ann. Rev. Nutr. – 2010. – 30. – P. 57–81.*
- McCully K. S. // Am. J. Clin. Nutr. – 2007. – 86, N 5. – P. 1563S–1568S.*
- Wierzbicki A. S. // Diab. Vasc. Dis. Res. – 2007. – 4, N 2. – P. 143–150.*
- Ueland P. M., Refsum H., Beresford S. A., Vollset S. E. // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – 72, N 2. – P. 324–332.*
- Clarke R. // Int. J. Epidemiol. – 2002. – 31, N 1. – P. 70–71.*
- Stanger O., Fowler B., Piertz K. et al. // Expert. Rev. Neurother. – 2009. – 9, N 9. – P. 1393–1412.*
- Folstein M., Liu T., Peter I. et al. // Am. J. Psychiatry. – 2007. – 164, N 6. – P. 861–867.*
- Obeid R., Herrmann W. // FEBS Lett. – 2006. – 580, N 13. – P. 2994–3005.*
- Heafield M. T., Fearn S., Steventon G. B. et al. // Neurosci. Lett. – 1990. – 110, N 1–2. – P. 216–220.*
- McCully K. S. // Ann. Clin. Lab. Sci. – 1994. – 24, N 1. – P. 27–59.*
- Eussen S. J., Vollset S. E., Iglund J. et al. // Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2010. – 19, N 5. – P. 1328–1340.*
- Zacho J., Yazdanyar S., Bojesen S. E. et al. // Int. J. Cancer. – 2011. – 128, N 3. – P. 644–652.*
- Aubard Y., Darodes N., Cantaloube M. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2000. – 93, N 2. – P. 157–165.*
- Nelen W. L., Blom H. J., Steegers E. A. et al. // Obstet. Gynecol. – 2000. – 95, N 4. – P. 519–524.*
- D'Uva M., Di Micco P., Strina I. et al. // Thrombosis J. – 2007. – 5:10.*
- Obwegeser R., Hohlagschwandtner M., Sinzinger H. // Hum. Reprod. Update. – 1999. – 5, N 1. – P. 64–72.*
- Зозуля Ю. А., Орлов Ю. А. / Научно-практическая международная конференция «Фортификация пищевых продуктов витамином В₉ с целью предупреждения врожденных дефектов невральнoй трубки». – 2006, Киев, Украина. – С. 14.*
- Полька О. О., Поканевич Т. М., Личак О. В., Тимченко О. І. // Гігієна населених місць. – 2005. – 48. – С. 413–416.*
- Тимченко О. І., Єлагін В. В., Галаган В. О. та ін. // Педіатрія, акушерство та гінекологія. – 2001. – 5. – С. 5–8.*
- Tsitsiou E., Sibley C. P., D'Souza S. W. et al. // J. Inherit. Metab. Dis. – 2011. – 34. – P. 57–65.*
- Molloy A. M., Mills J. L., McPartlin J. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2002. – 186, N 3. – P. 499–503.*

28. Yang H., Ara A. I., Magilnick N. et al. // Gastroenterology. — 2008. — **131**, N 1. — P. 281–291.
29. Mato J. M., Alvarez L., Ortiz P., Pajares M. A. // Pharmacol. Theor. — 1997. — **73**, N 3. — P. 265–280.
30. Boumber Y. A., Kondo Y., Shen L. et al. // Proc. Amer. Assoc. Cancer. Res. — 2004. — **45**. — P. 456–468.
31. McMinn J., Wei M., Schupf N. et al. // Placenta. — 2006. — **27**, N 6–7. — P. 540–549.
32. Wang R. Y., Huang L. H., Ehrlich M. // Nucleic Acids Res. — 1984. — **12**, N 8. — P. 3473–3490.
33. Porta R., Esposito C., Pietra G. D. // Int. J. Biochem. — 1977. — **8**, N 5. — P. 347–352.
34. Hershfield M. S., Aiyar V. N., Premakumar R., Small W. C. // Biochem. J. — 1985. — **230**, N 1. — P. 43–52.
35. Solanky N., Requena Jimenez A., D'Souza S. W. et al. // Placenta. — 2010. — **31**, N 2. — P. 134–143.
36. Utey C. S., Marcell P. D., Allen R. H. et al. // J. Biol. Chem. — 1985. — **260**, N 25. — P. 13656–13665.
37. Sunden S. L., Renduchintala M. S., Park E. I. // Arch. Biochem. Biophys. — 1997. — **345**, N 1. — P. 171–174.
38. Jarabak J., Bachur N. R. // Ibid. — 1971. — **142**, N 2. — P. 417–425.
39. Prasannan P., Pike S., Peng K. et al. // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**, N 31. — P. 43178–43187.
40. Krupenko S. A., Oleinik N. V. // Cell Growth Differ. — 2002. — **13**, N 5. — P. 227–236.
41. Vergis J. M., Bullock K. G., Fleming K. G., Beardsley G. P. // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 11. — P. 7727–7733.
42. Kornmann M., Schwabe W., Sander S. et al. // Clin. Cancer. Res. — 2003. — **9**, N 11. — P. 4116–4124.
43. Lewis R. M., Godfrey K. M., Jackson A. A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2005. — **90**, N 3. — P. 1594–1598.
44. Марценюк О. П., Романець К. Л., Оболенська М. Ю., Хупертиц Б. // Укр. біохім. журн. — 2009. — **81**, № 5. — P. 40–49.
45. Patel P., Vatish M., Heptinstall J. et al. // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2009. — **7**, 10.
46. Griffith O. W., Mulcahy R. T. // Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. — 1999. — **73**. — P. 209–267.
47. Wellner V. P., Sekura R., Meister A., Larsson A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1974. — **71**, N 6. — P. 2505–2509.
48. Avissar N., Eisenmann C., Breen J. G. et al. // Am. J. Physiol. — 1994. — **267**, N 1. Pt 1. — P. E68–76.
49. Qanungo S., Mukherjea M. // Mol. Cell Biochem. — 2000. — **215**, N 1–2. — P. 11–19.
50. Takayanagi M., Kure S., Sakata Y. et al. // Hum. Genet. — 2000. — **106**, N 3. — P. 298–305.
51. Langkamp-Henken B., Geller A. M., LeGros H. L. et al. // Biochim. Biophys. Acta. — 1994. — **1201**, N 3. — P. 397–404.
52. Martinov M. V., Vitvitsky V. M., Mosharov E. V. et al. // J. Theor. Biol. — 2000. — **204**, N 4. — P. 521–532.
53. Gasparovic J., Raslova K., Basistova Z. et al. // Physiol. Res. — 2004. — **53**, N 2. — P. 215–218.
54. Pejchal R., Campbell E., Guenther B. D. et al. // Biochemistry. — 2006. — **45**, N 15. — P. 4808–4818.
55. Марценюк О. П., Мішланова Ш., Романець К. Л. та ін. // Укр. біохім. журн. — 2009. — **81**, № 4. — С. 94–104.
56. Finkelstein J. D. // Semin. Thromb. Hemost. — 2000. — **26**, N 3. — P. 219–225.
57. Романець К. Л., Марценюк О. П., Оболенська М. Ю. // Укр. біохім. журн. — 2010. — **82**, № 4 (додаток 1). — С. 232.
58. Kraus J., Packman S., Fowler B., Rosenberg L. E. // J. Biol. Chem. — 1978. — **253**, N 18. — P. 6523–6528.
59. Di Simone N., Maggiano N., Caliandro D. et al. // Biol. Reprod. — 2003. — **69**, N 4. — P. 1129–1134.
60. Kamudhamas A., Pang L., Smith S. D. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. — 2004. — **191**, N 2. — P. 563–571.
61. Holmes V. A., Wallace J. M., Alexander H. D. et al. // Clin. Chem. — 2005. — **51**, N 3. — P. 629–634.
62. Steegers-Theunissen R. P., Van Iersel C. A., Peer P. G. et al. // Obstet. Gynecol. — 2004. — **104**, N 2. — P. 336–343.
63. Goswami D., Tannetta D. S., Magee L. A. et al. // Placenta. — 2006. — **27**, N 1. — P. 56–61.
64. Raijmakers M. T. M., Steegers E. A. P., Peters W. H. M. // Hum. Reprod. — 2001. — **16**, N 11. — P. 2445–2450.
65. Hogg N. // Free Radic. Biol. Med. — 1999. — **27**, N 1–2. — P. 28–33.
66. El-Khairi L., Vollset S. E., Refsum H., Ueland P. M. // Am. J. Clin. Nutr. — 2003. — **77**, N 2. — P. 467–472.
67. McCully K. S. // Ann. Clin. Lab. Sci. — 2009. — **39**, N 3. — P. 219–232.

Отримано 10.01.2011