

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания,
биотехнологии и безопасности пищи

На правах рукописи

Балакина Анастасия Станиславовна

**ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПИЩИ –
АНТИОКСИДАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ NRF2-РЕГУЛИРУЕМЫХ
ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС**

1.5.4 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор
Тутельян Виктор Александрович

Москва – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Природные антиоксиданты – экзогенные регуляторы адаптационного потенциала	12
1.1.1 Кверцетин.....	14
1.1.2 Рутин.....	16
1.1.3 Гесперидин.....	18
1.1.4 Ресвератрол.....	20
1.1.5 Куркумин	22
1.1.6 Эпигаллокатехингаллат	23
1.1.7 Индол-3-карбинол	25
1.2 Система антиоксидантной защиты организма и её регуляция	27
1.2.1 Антиоксидант респонсивный элемент	28
1.2.2 Ядерный фактор 2-родственный эритроидному фактору 2	29
1.2.3 Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1	30
1.2.4 НАД(Ф)Н:хиноноксидоредуктаза.....	32
1.2.5 Гемоксигеназа-1	33
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	36
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1 Экспериментальные животные	36
2.2 Условия экспериментов.....	36
2.3 Подготовка материала для исследований (выделение фракций печени)	39
2.4 Методы биохимических исследований.....	40
2.4.1 Определение содержания белка.....	40
2.4.2 Определение активности гемоксигеназы-1	40
2.4.3 Определение активности NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы.....	41
2.5 Определение содержания мРНК β -актина (<i>Actb</i>), гемоксигеназы-1 (<i>Hmox1</i>), NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы (<i>NQO1</i>) и транскрипционного фактора Nrf2 (<i>Nrf2</i>).....	41
2.6 Определение содержания специфических белков: β -актина (актин), глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), гемоксигеназы-1 (ГО-1), NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы (ХР) и транскрипционных факторов Nrf2 и SP-1.....	43
2.7 Методы статистической обработки экспериментальных данных	44

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИНОРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПИЩИ – АНТИОКСИДАНТОВ, НА АКТИВНОСТЬ, ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА И ГЕНА NRF2-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИХ РАЗДЕЛЬНОМ И СОЧЕТАННОМ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ46

- 3.1 Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм46
- 3.2 Изучение влияния кверцетина и ресвератрола на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм58
- 3.3 Изучение влияния куркумина и кверцетина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм68
- 3.4 Изучение влияния индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм77

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИНОРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПИЩИ – АНТИОКСИДАНТОВ, НА АКТИВНОСТЬ, ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА И ГЕНА NRF2-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИХ РАЗДЕЛЬНОМ И СОЧЕТАННОМ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТОГО УГЛЕРОДА ...87

- 4.1 Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода87
- 4.2 Изучение влияния куркумина и кверцетина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода 102

ЗАКЛЮЧЕНИЕ116

ВЫВОДЫ.....120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....123

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

К одному из важных достижений науки о питании следует отнести расшифровку роли минорных биологически активных веществ (БАВ) пищи в регуляции метаболизма и в механизмах адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды, в сохранении здоровья и снижении риска развития заболеваний [Тутельян В.А. и соавт., 2011; 2013; 2020; Durazzo A. et al., 2019].

Особое значение для процессов адаптации имеют связанные общими путями регуляции и взаимодействующие между собой полифункциональные системы, обеспечивающие защиту клетки от повреждающего действия экзогенных и эндогенных факторов – система суперсемейства цитохромов P-450 (ферменты I фазы метаболизма ксенобиотиков), ферменты конъюгации (ферменты II фазы метаболизма ксенобиотиков) и ферменты системы антиоксидантной защиты.

Фактор транскрипции Nrf2 занимает центральное место в системе клеточной защиты от повреждений, вызванных электрофильными соединениями и оксидантами. Ферментами – маркерами активации транскрипционного фактора Nrf2 являются NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза (ХР) и митохондриальная гемоксигеназа-1 (ГО-1).

ХР представляет собой флавопротеин, катализирующий восстановление широкого спектра эндогенных и экзогенных хинонов. Антиоксидантная активность ХР реализуется за счет ингибирования окислительно-восстановительных циклических трансформаций хинонов и образования активных форм кислорода (АФК) - супероксидного аниона и перекиси водорода [Ляхович В.В. и соавт., 2006; Ross D. et al., 2017, 2021; Saha S. et al., 2020].

ГО-1 является лимитирующим звеном метаболизма прооксидантного гема, превращая его в билирубин, обладающий антиоксидантным действием в отношении супероксидных и пероксильных радикалов, с высвобождением атома железа и монооксид углерода. Повышение активности ГО-1, как полагают,

является одним из основных механизмов защиты клетки при окислительном стрессе [Ляхович В.В. и соавт., 2006; Турпаев К.Т., 2013; Johmura Y. et al., 2021; Yachie A., 2021].

Функциональное состояние ферментных систем метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты организма во многом зависит от состава пищи. При этом как макронутриенты, так и минорные составляющие рациона питания могут оказывать значительное влияние на биотрансформацию ксенобиотиков и оксидантов.

Полифенолы представляют собой вторичные метаболиты, широко распространенные в чае, кофе, вине, фруктах, овощах, злаках и какао [Zhang S. et al., 2021]. В продуктах питания они зачастую встречаются в виде сложных эфиров гликозидов, либо в виде свободных агликонов [Singla R.K. et al., 2019]; гликозилирование/этерификация влияет на абсорбцию полифенолов в кишечнике и биодоступность [Zamora-Ros R. et al., 2016]. В соответствии с их химической структурой полифенолы классифицируются на флавоноиды (такие как флавоны, флавонолы, изофлавоны, неофлавоноиды, халконы, антоцианидины и проантоцианидины), не-флавоноиды (такие как, стильбеноиды и амиды фенолов) и фенольные кислоты [Matacchione G. et al., 2020]. В настоящее время к числу наиболее изучаемых БАВ относятся индол-3-карбинол и флавоноиды: кверцетин, рутин, гесперидин, ресвератрол, куркумин и эпигаллокатехин-3-галлат.

Эпидемиологические исследования последних лет свидетельствуют о том, что одним из факторов возникновения и прогрессирования некоторых алиментарно-зависимых заболеваний являются нарушения в структуре питания [Bruins M.J. et al., 2019; Тутельян В.А. и соавт., 2020; Попова А.Ю. и соавт., 2021]. Регулярное употребление с рационом пищи, богатой полифенолами приводит к снижению риска развития многих неинфекционных заболеваний, таких как рак, сердечно-сосудистые заболевания, диабет 2 типа, остеопороз [Vauzour D. et al., 2010; Andriantsitohaina R. et al., 2012; Spagnuolo C. et al., 2012; Alam M. N. et al., 2013; Liu R.H., 2013; Martin-Pelaez S., 2013; Fujiki H. et al., 2015; Xiao J.B. et al., 2015; Cory H. et al., 2018; Gentile D. et al., 2018; Yahfoufi N. et al., 2018; Williamson

G. et al., 2018; Durazzo A. et al., 2019; Guven H. et al., 2019]. Предполагается, что эти эффекты связаны со способностью полифенолов удалять свободные радикалы [Scott M.B. et al., 2022].

Результаты, полученные в исследованиях *in vitro*, свидетельствуют о том, что многие минорные БАВ, в том числе флавоноиды и индолы, обладают антиоксидантными свойствами, но данные, подтверждающие их антиоксидантное действие *in vivo*, фрагментарны и имеют противоречивый характер. В связи с этим, изучение влияния БАВ с антиоксидантными свойствами на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов и экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 является актуальным для расширения представлений о молекулярных механизмах регуляторного действия БАВ и имеет как теоретическое, так и практическое значение.

Окислительный стресс является одним из патогенетических звеньев развития различных заболеваний. Индуцированное четыреххлористым углеродом (CCl₄) поражение печени *in vivo* широко используется в экспериментальной токсикологии. Известно, что токсическое действие CCl₄ связано, в первую очередь, с эффектами образующихся в процессе его метаболизма свободных радикалов – трихлорметила CCl₃^{*} и высокореактивного трихлорметилпероксида CCl₃OO^{*}. Данные литературы свидетельствуют об эффективном использовании данной модели для скрининга *in vivo* гепатопротекторной и антиоксидантной активности химических соединений различной природы и БАВ [Кравченко Л.В. и соавт., 2009; Ускова М.А. и соавт., 2010, Lee H.Y. et al., 2016]. При этом, молекулярные механизмы *in vivo* сочетанного воздействия БАВ на антиоксидантный статус в условиях окислительного стресса до настоящего времени практически не изучены.

В связи с вышеизложенным, **целью исследования** являлось изучить влияние некоторых минорных БАВ пищи – антиоксидантов, на активность, экспрессию генов и белков Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и сочетанном поступлении в организм здоровых интактных животных и на модели окислительного стресса.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» в рамках тем № 147 «Изучение молекулярных механизмов действия минорных биологически активных веществ пищи при их отдельном и комбинированном поступлении в организм».

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

1. В экспериментах *in vivo* у крыс изучить влияние индивидуального и комбинированного действия БАВ пищи – ряда природных антиоксидантов (рутина, гесперидина, кверцетина, ресвератрола, куркумина, эпигаллокатехингаллата, индол-3-карбинола) на активность, экспрессию генов и белков Nrf2-регулируемых ферментов – ГО-1 и ХР в печени крыс.

2. Исследовать эффекты индивидуального и комбинированного действия рутин, гесперидина, кверцетина, ресвератрола, куркумина, эпигаллокатехингаллата, индол-3-карбинола на экспрессию гена и белка транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс.

3. На модели окислительного стресса, вызванного CCl₄, изучить *in vivo* влияние индивидуального и комбинированного действия БАВ пищи - антиоксидантов (рутин, гесперидин, кверцетин, куркумин) на экспрессию гена и белка транскрипционного фактора Nrf2 и на активность и экспрессию генов и белков Nrf2-регулируемых ферментов - ГО-1 и ХР в печени крыс.

Научная новизна

Впервые в эксперименте *in vivo* показано, что высокие, но нетоксичные дозы рутин, как при отдельном, так и при совместном с гесперидином включении в рацион здоровых интактных крыс не оказывают значительного влияния на экспрессию гена и белка транскрипционного фактора Nrf2, и что обнаруженное при этом возрастание активности ХР, не связано с усилением экспрессии гена *NQO1*. При этом комбинированное действие рутин и гесперидина приводит к двукратному аддитивному эффекту на экспрессию белка ГО-1.

Установлено, что совместное действие кверцетина и ресвератрола умеренно активирует ГО-1 и ХР, повышая экспрессию их белков, не влияя на экспрессию их

генов. Совместное введение куркумина и кверцетина, а также индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата приводит к избирательному возрастанию активности ГО-1, не влияя на экспрессию белка ГО-1 и экспрессию гена *Hmox1*.

Впервые обнаружено, что рутин отдельно и совместно с гесперидином при поступлении в составе рациона снижают степень окислительного стресса, индуцированного CCl_4 , чему соответствует возрастание в печени животных активности ГО-1 и экспрессии её гена, а также восстановление, как минимум, до контрольного уровня сниженной под действием CCl_4 активности ХР и экспрессии гена *NQO1*.

На модели острой интоксикации CCl_4 у крыс продемонстрирована способность куркумина и кверцетина при совместном включении в рацион значительно уменьшать индуцирующее действие CCl_4 на активность и экспрессию белка ГО-1. В то же время, введение CCl_4 крысам, получавшим совместно куркумин и кверцетин, приводит к возрастанию уровня экспрессии гена ХР в 3,6 раз.

Полученные данные свидетельствуют, что регуляция активности антиоксидантных ферментов ГО-1 и ХР в печени под влиянием БАВ пищи полифенольной природы и индол-3-карбинола у здоровых животных и на модели острого окислительного стресса может осуществляться как за счет влияния на экспрессию их генов с участием *Nrf2/Keap1/ARE* сигнального пути, так и на посттранскрипционном уровне.

Практическая значимость работы

Результаты настоящей работы использованы при обосновании включения некоторых изученных БАВ пищи в «Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации» (МР 2.3.1.0253—21). Результаты комбинированного действия БАВ пищи полифенольной и индольной природы в различных сочетаниях могут быть использованы при научном обосновании рецептур многокомпонентных БАД.

Результаты исследований по взаимосвязи экспрессии генов антиоксидантных ферментов ГО-1 и ХР с индукцией их белков и активности при воздействии минорных БАВ пищи внедрены в учебный процесс кафедры гигиены питания и токсикологии ФГАОУ ВО «ПМГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет) и используются в дополнительной профессиональной программе повышения квалификации «Основы здорового питания. БАД к пище: проблемы безопасности» и в лекционном курсе для студентов специальностей «Лечебное дело» и «Стоматология» кафедры Медицинской элементарологии Медицинского института РУДН.

Положения, выносимые на защиту

1. Включение в рацион интактных крыс полифенольных соединений (рутина, гесперидина, кверцетина, ресвератрола, куркумина, эпигаллокатехингаллата) и индол-3-карбинола и/или их сочетаний вызывает возрастание активности и экспрессии белков защитных антиоксидантных ферментов в печени крыс – ГО-1 и ХР, без значительного увеличения экспрессии их мРНК, что может свидетельствовать о воздействии биологически активных веществ на посттранскрипционные стадии синтеза и процессинга белков этих ферментов.

2. Полифенольные БАВ пищи у интактных животных способны оказывать модулирующее влияние на экспрессию гена Nrf2, являющегося универсальным регулятором защитных систем клетки.

3. На модели острой интоксикации CCl_4 включение биологически активных веществ рутина, гесперидина, кверцетина, куркумина в состав рациона влияет на уровни экспрессии белков и активности антиоксидантных ферментов ГО-1 и ХР, что свидетельствует о повышении адаптационного потенциала организма.

4. Механизмы антиоксидантного, органопротекторного и адаптогенного действия полифенольных соединений пищи и индол-3-карбинола в определенной

степени связаны с их стимулирующим действием на активность и экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты – ГО-1 и ХР.

Апробация материалов диссертации

Результаты исследования доложены и обсуждены на школе молодых ученых в рамках XVI Всероссийского Конгресса нутрициологов и диетологов с международным участием, посвященного 100-летию со дня рождения основателя отечественной нутрициологии академика А.А. Покровского «Фундаментальные и прикладные аспекты нутрициологии и диетологии. Качество пищи» (г. Москва, 2016 г.), I Школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (г. Москва, 2016 г.), XII Всероссийском съезде гигиенистов и санитарных врачей «Российская гигиена – развивая традиции, устремляемся в будущее» (г. Москва, 2017 г.), IV Школе молодых ученых с международным участием «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. Микронутриенты и минорные биологически активные вещества пищи» (г. Москва, 2021 г.), Республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии» (г. Ташкент, 2022 г.).

Личный вклад автора

Все результаты экспериментальных исследований, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно или при ее непосредственном участии. Постановка цели и задач исследования, выбор методических подходов, анализ и обобщение результатов осуществлялись совместно с научным руководителем. Личное участие в сборе, накоплении и систематизации научных материалов, анализе, интерпретации, обобщении и изложении материалов диссертации составляет не менее 80%.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 13 печатных работ, в том числе 4 – в изданиях, рецензируемых в базах данных Scopus, Web of Science и рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, содержит 28 таблиц и иллюстрирована 30 рисунками. Указатель литературы включает 272 источников, из которых 30 на русском и 242 на иностранных языках.

Благодарность

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в подготовке диссертационной работы ведущему научному сотруднику Лаборатории энзимологии питания, кандидату медицинских наук Кравченко Лидии Васильевне и главному научному сотруднику Лаборатории пищевой токсикологии и оценки безопасности нанотехнологий, доктору биологических наук Гмошинскому Ивану Всеволодовичу, а также сотрудникам Лаборатории энзимологии питания за помощь на всех этапах исследования.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Природные антиоксиданты – экзогенные регуляторы адаптационного потенциала

Антиоксиданты представляют собой эндогенные или экзогенные вещества, которые предотвращают, задерживают или восстанавливают окислительное повреждение биологических макромолекул [Halliwell В. 2007]. В организме человека в зависимости от наличия или отсутствия ферментативной активности антиоксиданты подразделяются на две основные группы - ферментные антиоксиданты и неферментные (Рисунок 1) [Foshati S. et al., 2022]. Первые делятся на две группы – первичные ферменты (глутатионпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза) и вторичные (глутатионредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа). К неферментным антиоксидантам относятся такие соединениями, как витамины, кофакторы ферментов, соединения азота, пептиды, минералы и полифенолы. Последние представляют собой наиболее обширную и наименее изученную группу.

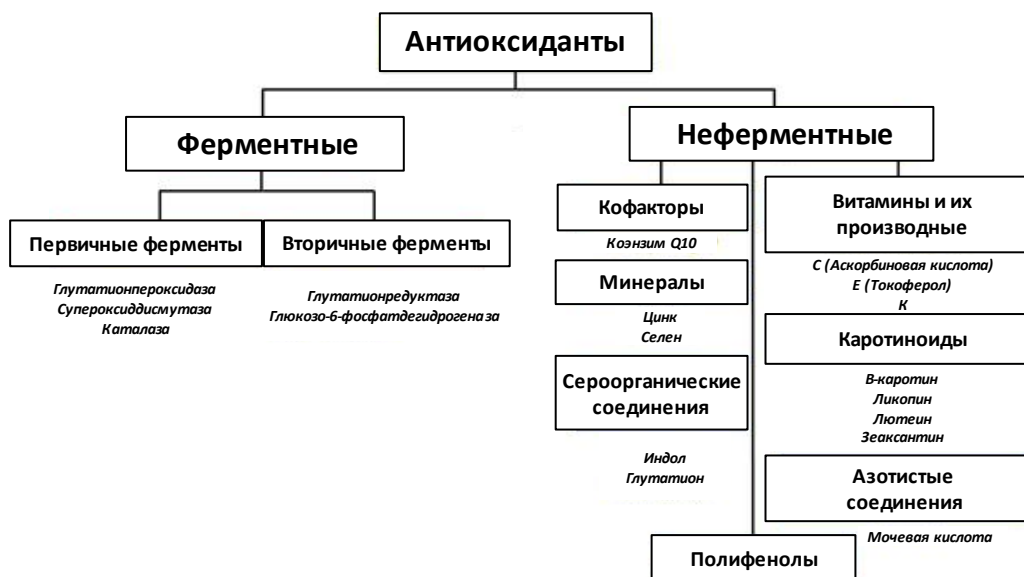


Рисунок 1 – Классификация антиоксидантов

Природные полифенолы представляют собой класс биомолекул, широко встречающихся в растениях, большинство из которых содержится в овощах,

фруктах, орехах, соевых бобах, какао-бобах, чае, вине и др. [Zhang S. et al., 2021]. В семействе полифенолов существует более 8000 структурных вариантов, в растениях они содержатся в виде сложных эфиров гликозидов, либо в виде свободных агликонов [Singla R.K. et al., 2019]. В соответствии с их химической структурой полифенолы классифицируются (Рисунок 2) на флавоноиды (такие как флавоны, флавонолы, изофлавоны, неофлавоноиды, халконы, антоцианидины и проантоцианидины), не-флавоноиды (такие как, стильбеноиды и амиды фенолов) и фенольные кислоты [Matacchione G. et al., 2020].

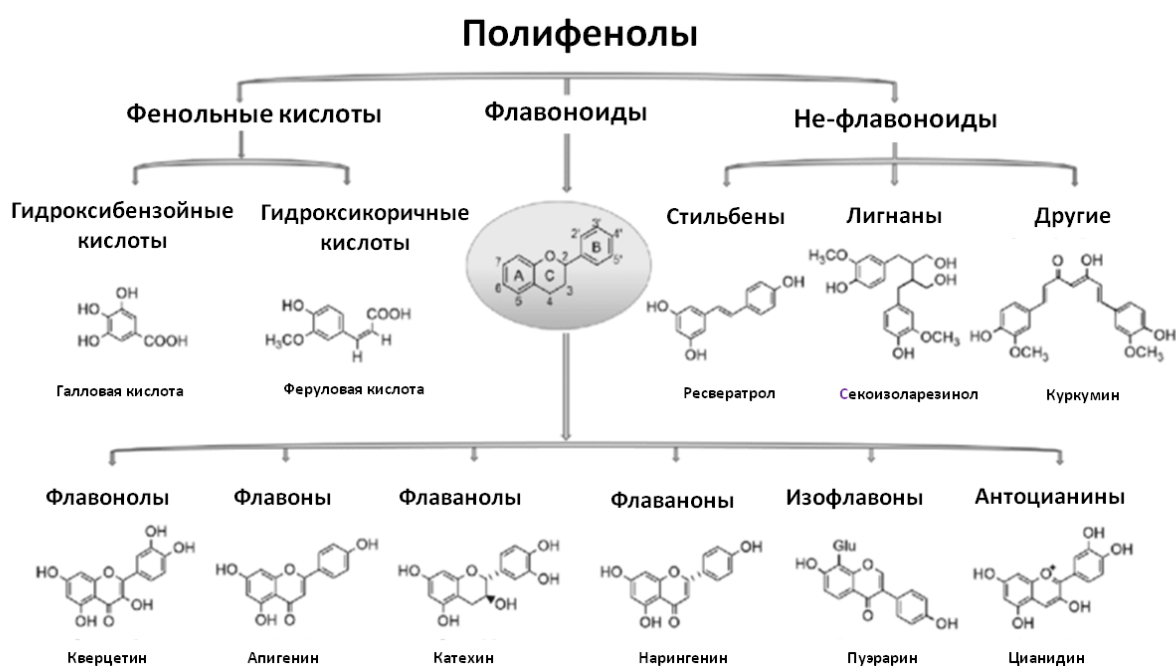


Рисунок 2 – Общая схема классификации полифенолов

Экспериментальные и клинические исследования показывают, что антиоксидантные и противовоспалительные свойства полифенолов могут потенциально предотвращать или служить средством положительной коррекции течения неинфекционных заболеваний [Vauzour D. et al., 2010; Andriantsitohaina R. et al., 2012; Spagnuolo C. et al., 2012; Alam M. N. et al., 2013; Liu R.H., 2013; Cory H. et al., 2018; Gentile D. et al., 2018; Yahfoufi N. et al., 2018; Williamson G. et al., 2018; Guven H. et al., 2019]. Имеются данные, что потребление пищи богатой

полифенолами, может снизить риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, ожирения [Durazzo A. et al., 2019]. Предполагается, что эти эффекты связаны с «теорией биохимических поглотителей», то есть со способностью полифенолов удалять свободные радикалы, образуя стабилизированные химические комплексы [Scott M.B. et al., 2022]. Альтернативным механизмом защиты от окислительного стресса, является способность полифенолов регулировать иммунный ответ, путем образования перекиси водорода (H_2O_2) [Saeidnia S. et al., 2013].

Флавоноиды представляют собой группу полифенольных соединений, образующихся в растениях в виде вторичных метаболитов. Флавоноиды широко распространены во фруктах и овощах. Основной биологической активностью флавоноидов, которая широко изучена, является их антиоксидантная активность [Gentile D. et al., 2018, Williamson G. et al., 2018, Guven H. et al., 2019, Shen N. et al., 2022], способная предотвращать свободнорадикальное повреждение клетки за счет поглощения АФК, активации антиоксидантных ферментов, ингибирования оксидаз и восстановления α -токоферильных радикалов [Williamson G. et al., 2018].

1.1.1 Кверцетин

Кверцетин является наиболее распространенным представителем флавоноидов в рационе человека, подкласс флавонол (Рисунок 3) [Benvenuto M. et al., 2020].

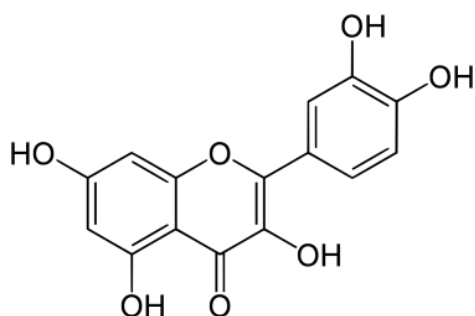


Рисунок 3 – Структурная формула флавоноида кверцетина

По данным [Chua L.S. et al., 2013] на долю кверцетина приходится 50-70% суточного потребления флавоноидов человеком, содержится в основном в салате (40,27 мг/100 г), перце (32,59 мг/100 г), луке (12,65-17,22 мг/100 г), черноплодной рябине (8,90 мг/100 г), томатах (4,56 мг/100 г), брокколи (4,25 мг/100 г) и яблоках (2,47 мг/100 г) [Luca S.V. et al., 2020].

Существует многочисленные доказательства того, что кверцетин обладает антиоксидантными, противовоспалительными, антиканцерогенным, антибактериальными, кардиопротекторными и нейропротекторными свойствами [Choi S.J. et al., 2012; de Araujo M. E. et al., 2013; Kobori M. et al., 2015; Chen L. et al., 2017; Gullon B. et al., 2017; Lee S. et al., 2019]. Было обнаружено, что кверцетин обладает высокой эффективностью при лечении заболеваний печени [Miltonprabu S. et al., 2017], включая улучшение метаболических функций, снижение уровня холестерина в сыворотке крови, уменьшение воспаления и окислительного стресса [Batiha G.E. et al., 2020, Zhao X. et al., 2021]. В работе [Lee S. et al., 2019] *in vitro* оценивали цитопротекторные эффекты кверцетина, кверцетин-3-глюкозида и рутина в различных концентрациях (5–20 мкМ) на клетках печени человека. Кверцетин и его гликозиды значительно предотвращали вызванную 5% этанолом гепатотоксичность, что выражалось в снижении уровней аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в клетках линии HepG2. Также, при добавлении кверцетина, кверцетин-3-глюкозида и рутина (10 мкМ) выявляли индукцию экспрессии белка антиоксидантного фермента ГО-1, а также повышение количества ядерного белка Nrf2 в обработанных этанолом клетках HepG2.

В исследовании на клетках линии Hep1c1c7 было показано, что инкубация гепатоцитов человека с кверцетином (10–100 мкМ) приводила к дозозависимой индукции активности фермента и количества белка ГО-1, при этом межклеточный пул гема уменьшался дозозависимым образом [Tang Y. et al., 2016]. В этих же исследованиях показано, что внутрижелудочное введение кверцетина (100 мг/кг массы тела (м.т.)) самцам крыс Sprague Dawley в течение 90 дней приводило к увеличению в 2,66 раза активности ГО-1 в микросомах печени крыс по сравнению

с контрольной группой, тогда как другие изученные антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза) не отличались от контроля, что указывает на потенциальные антиоксидантные свойства ГО-1 у интактных животных.

В исследованиях на крысах самцах Вистар, было показано, что ежедневное внутрижелудочное введение животным в течение 10 дней кверцетина (50 мг/кг/м.т./сут) не оказывало влияние на состояние печени и систему антиоксидантной защиты, однако у крыс после интоксикации циклофосфамидом (200 мг/кг м.т.) добавка кверцетина снижала уровень малонового диальдегида (МДА) и повышала уровни глутатиона, супероксиддисмутазы и каталазы в ткани печени по сравнению с крысами, подвергавшимся интоксикации. Также у крыс, получавших кверцетин и циклофосфамид наблюдалась заметная активация экспрессии генов *Nrf2* и *Hmox-1* (ГО-1) [Sherif I.O. et al., 2018].

1.1.2 Рутин

Рутин (кверцетин-3-О-рутинозид) – гликозид кверцетина (Рисунок 4). Рутин содержится в гречке (200-1000 мг/100 г), винограде, яблоках, цитрусовых, каперсах, луке, спарже и чае ройбуш [Guo Y. et al., 2015; Luca S.V. et al., 2016; Wang W. et al., 2016].

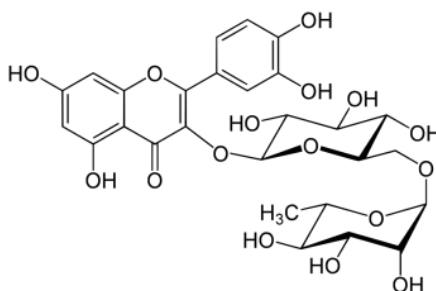


Рисунок 4 – Структурная формула флаваноида рутина

Также рутин обнаружен в некоторых лекарственных растениях, таких как *Ruta graveolens* L., *Sophora japonica* L. и *Eucalyptus* spp. Полагают, что в организме большая часть рутина достигает в неизменном виде толстый

кишечник, где подвергается действию бактериальных ферментов с образованием кверцетина, последующая фармакокинетика и фармакодинамика которого не отличается от поступающего в организм агликона кверцетина [Erlund I. et al., 2000; Manach C. et al., 1997].

В организме человека рутин действует как антиоксидант - предотвращая образование высокореактивных свободных радикалов [Ahmed O.M. et al., 2022]. Кроме того, сообщалось о ренокардиопротекторных, антидиабетических и антиканцерогенных свойствах рутина [Mahmoud H. U. R. et al., 2020; Ahmed O. M. et al., 2021]. Так, недавние исследования показали, что рутин оказывает гепатопротекторное действие при вызванном стрептозотоцином диабете у мышей [Li C.W. et al., 2018]. Reddy M.K. и соавт. [(2017)] показали превосходство рутина над силимарином в восстановлении патологических изменений индуцированной парацетамолом гепатотоксичности у крыс Wistar. Несколько исследователей сообщили, что рутин может модулировать нефротоксичность за счет своего регулирующего влияния путей апоптоза, за счет снижения уровней TNF- α , NFkB и каспазы-3 [Alhoshani A.R. et al., 2017; Khajevand-Khazaei M.R. et al., 2018; Elsayy H. et al., 2019]

Рутин, как и его агликон кверцетин проявляют высокую антирадикальную и антиоксидантную активность в различных модельных системах *in vitro*, но в концентрациях значительно превышающих определяемые в физиологических условиях [Yang J. et al., 2008; Patil S.L. et al., 2013]. Следует отметить, что биологическая активность рутина и кверцетина может быть тесно связана с их способностью взаимодействовать с биологическими мембранами. В исследованиях с использованием искусственных мембран и некоторых линий клеток показано, что кверцетин уменьшает жидкость мембран, усиливает их стабильность и защищает от окислительного стресса не только за счет антирадикального действия, но и препятствуя проникновению и взаимодействию оксидантов с липидным бислоем [Verstraeten S.V. et al., 2010; Margina D. et al., 2012]. Изменение физических свойств мембран как следствие их взаимодействия

с кверцетином может сопровождаться изменением многих функций мембран, в том числе активности связанных с ними ферментов.

В недавних исследованиях на самцах крыс Wistar пероральное введение рутина и кверцетина (50 мг/кг м.т.) по отдельности или в комбинации значительно повышали сниженные введением доксорубина уровни АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Введение кверцетина и рутина животным, получавшим инъекцию доксорубина, предотвращало повышение перекисного окисления липидов в печени и снижение активности супероксиддисмутазы, глутатион-S-трансферазы, глутатионпероксидазы и содержание глутатиона [Ahmed O.M. et al., 2022].

1.1.3 Гесперидин

Гесперидин является флаваноновым гликозидом (Рисунок 5) и содержится в цитрусовых, таких как апельсин (*Citrus sinensis*), грейпфрут (*Citrus Paradise*), мандарин (*Citrus reticulata*), лайм (*Citrus aurantifolia*) и лимон (*Citrus limon*) [Hajjalyani M., et al., 2019]. Его содержание в цитрусовых зависит от сорта плода, части самого плода, климата и степени созревания, так в 100 мл апельсинового сока содержится 20-60 мг, мандаринового – 8-46 мг, лимонного – 4-41 мг и грейпфрутового – 2-17 мг [Pyrzynska K., 2022].

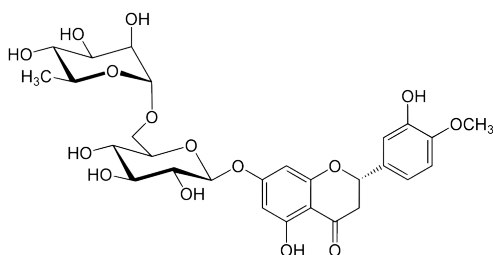


Рисунок 5 – Структурная формула флаваноида гесперидина

Гесперидин обладает антиоксидантной, противовоспалительной и антиканцерогенной активностью [Roohbakhsh A. et al., 2015; Tejada S. et al., 2018]. Согласно литературным данным антиоксидантная активность гесперидина

проявляется в снижении продукции АФК и повышении активности антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и супероксиддисмутаза [Estruel-Amades S. et al., 2019; Aalikhani M. et al., 2021]. Следует отметить, что гесперидин проявляет более низкую антиоксидантную активность по сравнению с его агликоновой формой, как и многие другие флавоноиды [Biesaga M. et al., 2013]. Кожура цитрусовых проявляет более высокую антиоксидантную способность, чем мякоть, из-за более высокого содержания флавоноидов, витамина С и каротиноидов [Hu Y. et al., 2018]. В исследованиях на модели болезни Альцгеймера в коре головного мозга мышей гесперидин (40 мг/кг м.т., 90 дней внутрижелудочно) снижал оксидантный статус за счет увеличения экспрессии ГО-1. Кроме того, этот флавоноид снижал уровни фактора некроза опухоли- α , С-реактивного белка и моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP-1), а также активность NF κ B, которые находились на высоких уровнях в процессе воспаления. Авторы также сообщили об активации гесперидином пути Nrf2/ARE и ингибировании сигнального пути NF κ B [Hong Y. et al., 2018]. Результаты, полученные на мезенхимальных стволовых клетках человека, позволяют предполагать, что гесперидин может оказывать противовоспалительное и антигипертензивное действие при диабете 2 типа [Xiao S. et al., 2018]. Кроме того, включение в рацион на протяжении 21 дня гесперицина (50 и 100 мг/кг м.т.) у крыс Sprague Dawley с диабетом, вызванным инъекцией стрептозотоцина (55 мг/кг м.т., внутривентриально), ингибировало потерю веса, снижало концентрацию инсулина, нормализовывало уровень глюкозы в крови, уменьшало потребление пищи и воды, повышало уровни активности супероксиддисмутазы и восстановленного глутатиона в ткани кожи, а также снижало уровни МДА и оксида азота [Li W. et al., 2018].

1.1.4 Ресвератрол

Ресвератрол - это природный полифенольный фитоалексин [Luca S.V. et al., 2020]. Его основная структура состоит из двух фенольных колец (Рисунок 6), соединенных двойной стироловой связью, которая образует два изомера (*цис*- и *транс*-), причем *транс*-изомер является наиболее стабильным и биологически активным [Fabjanowicz P. et al., 2018].

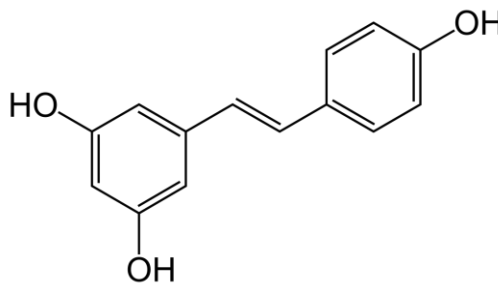


Рисунок 6 – Структурная формула стильбена ресвератрола

Ресвератрол содержится в винограде, некоторых ягодах и орехах. Содержание его в этих продуктах сильно варьируется. Например, содержание ресвератрола в винограде и вине зависит от сорта (генетические факторы), почвы, климатических особенностей, чувствительностью к действию патогенов (факторы окружающей среды) или технологии производства [El Khawand T. et al., 2020]. Так, в виноградной кожице 21 итальянского красного сорта винограда содержание ресвератрола колебалось от 19 до 508 мг/г (при среднем значении 169 мг/г) [Vincenzi S. et al., 2013], тогда как в винах оно, по имеющимся данным, составляло 1-20 мг/л [Di Donna L. et al., 2017]. Помимо винограда, значительные концентрации ресвератрола содержатся в ягодах *Morus* spp. (черная шелковица; до 32,5 мг/г), *Vaccinium* spp. (черника, голубика, клюква; до 0,77 мг/г), в арахисе (5,1 мг/г), скорлупе арахиса (91 мг/г) и арахисовом масле (0,3 мг/г). Недавние исследования выявили наличие ресвератрола в таких продуктах как ревень, банан, гуава, ананас, персик, яблоко, маракуй, груша, суринамская вишня, картофель, фисташки и огурец. Кроме того, многие другие растения богаты ресвератролом,

но они редко употребляются в пищу. Например, *Polygonum cuspidatum* (Рейнутрия японская) используется в Европе для получения ресвератрола, тогда как в Азии он входит в состав функциональных продуктов питания или лекарственных препаратов [Fabjanowicz P. et al., 2018; El Khawand T. et al., 2020]. Существуют противоречивые данные о суточном потреблении ресвератрола: в исследованиях сообщалось о значениях от 0,933 мг/день до 4 мг/день [Zamora-Ros R. et al. 2008; El Khawand T. et al., 2020]. Доказано, что ресвератрол обладает широким спектром биологической активности, включая антиоксидантные, антиканцерогенные, кардиопротекторные, противовоспалительные, антидиабетические и нейропротекторные свойства [Alamolhodaie N.S. et al. 2017; Giuliani C. et al. 2017; He Y. et al. 2017; Mallebrera B. et al. 2017; Yin X. et al. 2017; Dyrtrtova J.J. et al. 2018]. Полагают, что его универсальность связана со способностью взаимодействия с многочисленными молекулярными мишенями, такими как: циклооксигеназы, липоксигеназы, сиртуины, транскрипционные факторы, цитокины, ДНК-полимераза, аденилатциклаза и другие [Aires V. et al. 2014; El Khawand T. et al., 2020].

В различных модельных системах окисления ресвератрол активно перехватывал супероксидные анионрадикалы и гидроксильные радикалы и, аналогично α -токоферолу, подавлял перекисное окисление липидов, действуя, как перехватчик липидных пероксильных радикалов [De la Lastra C.A. et al., 2007]. Показано, что наряду с высокой антирадикальной активностью действие ресвератрола на культуры клеток разных типов приводило к активации транскрипционного фактора Nrf2 и возрастанию активности антиоксидантных и цитопротекторных ферментов [Rubiolo J.A. et al., 2008]. Так называемый «французский парадокс» - низкую частоту сердечно-сосудистых заболеваний у населения средиземноморского региона, в значительной мере связывают с высоким потреблением ресвератрола в составе рациона [Catalgol B. et al., 2012].

1.1.5 Куркумин

Куркумин – диферулоилметан (Рисунок 7), является основным биологически активным компонентом, получаемым из корневища куркумы (*Curcuma longa* L., *Zingiberaceae*), составляя от 0,58% до 3,14% от ее сухого веса [Таууем R.F. et al. 2006; Aggarwal B.V. et al. 2007].

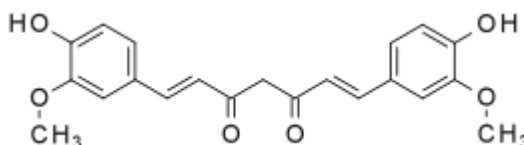


Рисунок 7 – Структурная формула куркумина

Куркумин имеет долгую историю использования в качестве специи, лекарственного средства и красителя; в сочетании с другими компонентами куркума образует порошок карри, диетическую приправу, используемую во всем мире [Esatbeyoglu T. et al. 2012]. Согласно Европейскому управлению по безопасности пищевых продуктов (EFSA) допустимое значение суточного потребления куркумина составляет 0-3 мг/кг м.т. (EFSA 2014). Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) одобрило куркуминоидный препарат (содержащий куркумин 75-81%) как общепризнанный безопасным (GRAS) [Mahran R.I. et al. 2017]. Обширные клинические исследования последних десятилетий показали, что куркумин обладает противовоспалительной, антиоксидантной, гипогликемической, ранозаживляющей, противомикробной и противоопухолевой активностью [Cretu E. et al. 2012; Prasad S. et al., 2014; Hewlings S.J. et al., 2017; Kocaadam B. et al., 2017; Kunnnumakkara A.V. et al. 2017]. Так же в экспериментальных исследованиях было показано наличие у куркумина антиоксидантной, противовоспалительной и антиканцерогенной активности [Rivera-Espinoza Y. et al., 2009, Schaffer M. et al., 2015], а также способности связывать металлы переменной валентности (Fe^{3+} и Cu^{2+}) [Heeba G.H. et al., 2014, Casas-Grajales S. et al., 2015].

Изучение антиоксидантных свойств куркумина в исследованиях *in vitro* проводили на звездчатых клетках печени крыс, для этого клетки обрабатывали глюкозооксидазой, которая значительно стимулировала образование АФК и увеличивала продукцию МДА по сравнению с контрольными клетками. Введение куркумина значительно снижало уровни АФК и МДА и повышало уровни глутатиона, а также уровень ядерной экспрессии Nrf2 [Liu Z. et al., 2016].

В исследовании [Di T.Q. et al., 2020] на модели пассивного нефрита (PHN) у самцов крыс Sprague Dawley включение в рацион куркумина (300 мг/кг/м.т./сутки) приводило к снижению уровней МДА и повышению – супероксиддисмутазы, глутатиона и каталазы в почках крыс PHN. Кроме того, куркумин подавлял экспрессию белков Bax, Caspase-3, p62, PI3K, p-AKT и p-mTOR и повышал уровни Bcl-2, beclin1, LC3, Nrf2 и ГО-1. Для оценки влияния куркумина на алкогольный стеатоз печени, вызванный внутрижелудочным введением этанола, крысы Sprague Dawley перорально получали этанол и куркумин в дозах 100, 200 и 400 мг/кг м.т. Куркумин снижал степень выраженности гиперлипидемии и стеатоза печени посредством модулирования экспрессии белка-1с, синтазы жирных кислот и рецептора-альфа, а также активности карнитинпальмитоилтрансферазы-1. Кроме того, куркумин дозозависимо индуцировал экспрессию белков и мРНК Nrf2 и FXR в печени крыс [Lu C. et al., 2015]. В этих же исследованиях *in vitro* на гепатоцитах человека линии LO2 этанол в концентрации 100 мМ снижал жизнеспособность клеток, а добавление куркумина (10, 20, 40 мкМ) восстанавливало их жизнеспособность в зависимости от дозы. Таким образом, авторы показали, что куркумин значительно подавляет индуцированное этанолом накопление липидов *in vivo* и *in vitro*.

1.1.6 Эпигаллокатехингаллат

Эпигаллокатехингаллат (ЭГКГ) является наиболее распространенным полифенолом чая и составляет примерно 59% от общего количества катехинов из листьев зеленого чая (Рисунок 8). Другие катехины в зеленом чае включают

эпигаллокатехин (ЭГК) (19%), эпикатехин-галлат (ЭКГ) (13,6%) и эпикатехин (ЭК) (6,4%) [Steinmann J. et al., 2013].

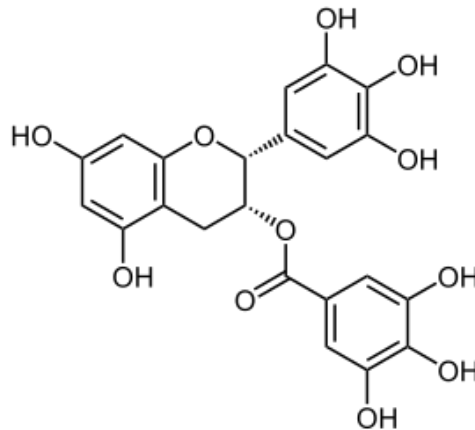


Рисунок 8 – Структурная формула эпигаллокатехин-3-галлата

Одна чашка зеленого чая содержит до 200 мг ЭГКГ [Khan N. et al., 2018]. Биологическое действие ЭГКГ зависит от концентрации. Исследования биодоступности после употребления чая показали низкие уровни ЭГКГ в плазме крови человека [Kim H.S. et al., 2014]. Циркулирующие уровни ЭГКГ достигают примерно 10 мкМ в исследованиях на мышах после перорального приема чистого ЭГКГ [Lambert J.D. et al., 2006].

ЭГКГ обладает сильным антиоксидантным, противовоспалительным, противоопухолевым действием [Zhong Y. et al., 2012; Avadhani K.S. et al., 2016; Cory N. et al., 2018]. Изучение регуляции апоптоза на клетках рака толстой кишки в присутствии низких доз H_2O_2 показало, что ЭГКГ оказывает индуцирующее влияние на апоптоз [Park I.J. et al., 2009]. Имеются данные о способности ЭГКГ модулировать активность ферментов метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты [Тутельян В.А. и соавт., 2009; Кравченко Л.В. и соавт., 2011]. Современные исследования показали, что ЭГКГ защищает от радиационного поражения кишечника у самцов мышей C57BL/6J и эпителиальных клеток кишечника человека, удаляя АФК и ингибируя апоптоз и ферроптоз через сигнальный путь Nrf2 [Xie L.W. et al., 2020].

Считается, что катехины предотвращают увеличение веса, способствуя увеличению расхода энергии и окислению жиров. Так, мета-анализ 11 рандомизированных исследований показал, что участники, рандомизированные для потребления зеленого чая, стабильно поддерживали потерю веса по сравнению с теми, кто не пьет зеленый чай [Hursel R. et al., 2011].

1.1.7 Индол-3-карбинол

Индол-3-карбинол (И-3-К) является метаболитом глюкозинолата глюкобрассицина (индолилметилглюкозинолата). Природным источником индол-3-карбинола являются овощи семейства крестоцветных: капуста цветная, редька, капуста Кале, капуста брокколи, белокочанная капуста, хрен, горчица. При механической обработке продуктов, а именно при разрушении растительной ткани, происходит высвобождение и активация мирозиназы, которая катализирует распад глюкобрассицина и других индольных глюкозинолатов с образованием И-3-К [Licznarska B. et al., 2016].

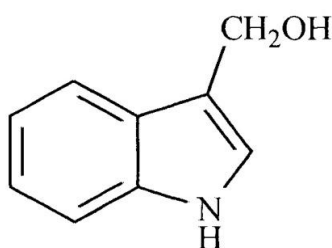


Рисунок 9 – Структурная формула индол-3-карбинола

В желудке, в зависимости от количества исходного индола и pH, И-3-К трансформируется в ряд соединений, таких как индоло[3,2-b]карбазол и др.. Самые высокие концентрации индолглюкозинолатов обнаруживали в листьях капусты *Brassica oleracea* - 840 мкмоль/100 г и *Brassica napus* - 465 мкмоль/100 г, а также в брюссельской капусте - 392 мкмоль/100 г. К овощам с более низким содержанием индолглюкозинолатов относятся *Brassica rapa tsoi-sim* (134

мкмоль/100 г), *Brassica choho* (149 мкмоль/100 г), брокколи рабе (187 мкмоль/100 г) и брокколи (188 мкмоль/100 г). К овощам семейства капустных с самыми низкими значениями относятся пекинская капуста, репа и китайская зелень, которые содержат глюкозинолаты в концентрации от 5 до 99 мкмоль/100 г сырой массы [Felker P. et al., 2016].

Основное биологическое действие И-3-К связывают с его способностью индуцировать активность изоформ цитохрома P-450, вероятно обусловленную сродством индола к транскрипционному фактору AhR [Leibelt D.A. et al., 2003; Riemschneider S. et al., 2021]. В ряде исследований подтверждена способность индолов активировать апоптоз в опухолевых клетках за счет выработки проапоптического белка [Hu R. et al., 2003], а также ингибировать ангиогенез посредством подавления фактора роста эндотелия сосудов [Wang M.L. et al., 2012]. Имеются данные, что И-3-К защищает от эстроген-ассоциированного канцерогенеза. Так в клеточных линиях рака молочной железы И-3-К повышает уровень ферментов глутатионтрансферазы и ХР, а в доброкачественных клетках линии MCF7 и агрессивной линии MDA-MB-231 способствует возрастанию глутатионтрансферазы и ХР, коррелируя с повышением уровня мРНК *Nrf2* [Licznarska B. et al., 2016]. Для изучения кардиозащитного потенциала самцам крыс Sprague Dawley перорально вводили И-3-К в дозе 20 мг/кг м.т., который ослаблял гипертрофию сердечной мышцы, вызванную высоким содержанием солей, и проявлял антигипертензивный эффект, аналогичный лозартану [Akkiraju S. et al., 2022].

1.2 Система антиоксидантной защиты организма и её регуляция

Несмотря на то, что кислород является абсолютно необходимым для жизни элементом, его способность образовывать, так называемые активные формы кислорода (АФК), является важным моментом в окислительном повреждении клетки (Рисунок 10). Цитотоксический эффект этих высокореакционных, преимущественно радикальных, кислородных соединений, которые образуются в фагоцитах и Т-киллерах, обеспечивается за счет элиминации патогенных микроорганизмов и собственных поврежденных клеток [Меньщикова Е.Б. и соавт., 2017; Diplock A.T. et al., 1997; Liguori I. et al., 2018]. АФК делятся на два подкласса: (I) высокореакционноспособные свободные радикалы, включающие супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), алкоксильный (OR^{\cdot}) и пероксильный радикалы (RO_2^{\cdot}) и (II) нерадикальные частицы, такие как перекись водорода (H_2O_2), синглетный кислород (O^1_2) и анион гипогалоиды (OCl^- , OBr^- , OI^-) [Herb M. et al., 2021].

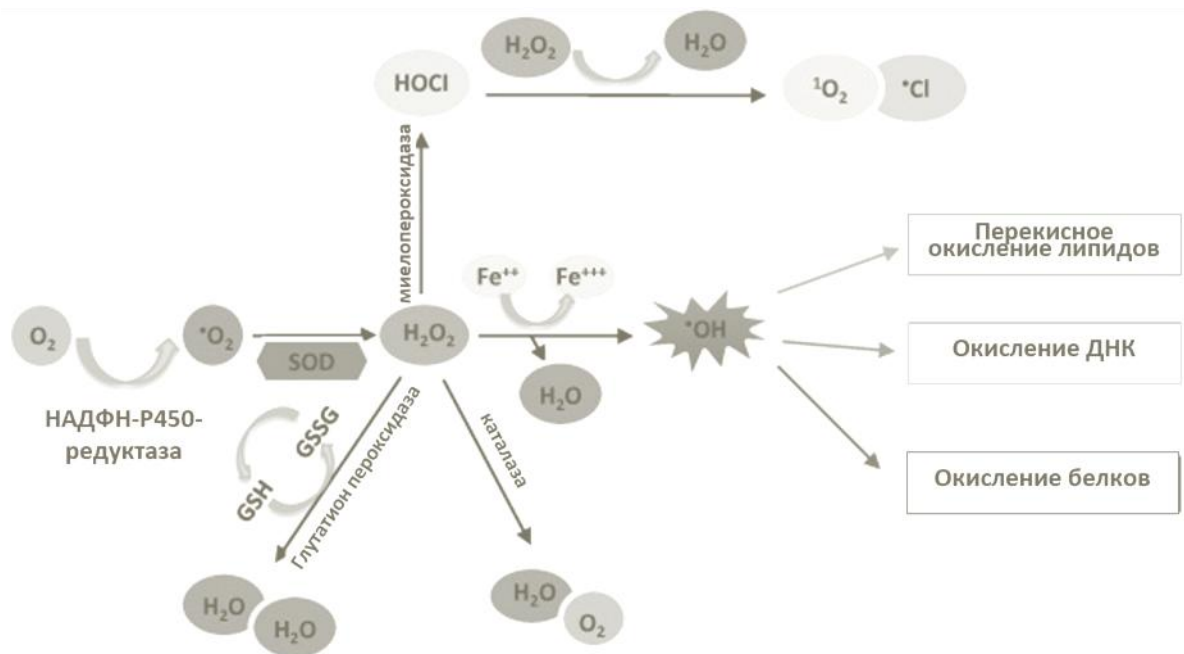


Рисунок 10 – Схема образования активных форм кислорода

Как правило, начальной реакцией является перенос одного электрона на кислород с образованием супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), который затем

расщепляется (спонтанно или катализируется супероксиддисмутазой) до перекиси водорода (H_2O_2) (Рисунок 10). Супероксидный анион-радикал плохо проникает через мембраны и действует недолго и локально, но супероксиддисмутаза превращает его в более долговечный и диффундирующий через мембраны пероксид водорода (H_2O_2) [Brieger K., 2012; Herb M. et al., 2021]. Когда супероксидный анион-радикал реагирует с оксидом азота (NO), образуется высокореактивный пероксинитрит ($ONOO^-$). Пероксидазы катализируют реакции с участием пероксида водорода, в результате чего образуется хлорноватистая кислота (HOCl) и синглетный кислород (O^1_2), среди прочих видов. Наконец, реакция Хабера-Вейсса использует катализатор ионы железа для образования гидроксильных радикалов из супероксидного анион-радикала и пероксида водорода [Yang S. et al., 2020].

Важное значение для защиты клетки от повреждающего действия экзогенных и эндогенных факторов имеют связанные общими путями регуляции и взаимодействующие между собой полифункциональные системы – система суперсемейства цитохромов P-450 (ферменты I фазы метаболизма ксенобиотиков), ферменты II фазы метаболизма ксенобиотиков (ферменты конъюгации) и системы антиоксидантной защиты. В настоящее время установлено, что ключевым фактором регуляции экспрессии генов ферментов системы антиоксидантной защиты является транскрипционный фактор Nrf2, а датчиками и ответчиками на сигнальных путях, соответственно, служат Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1) и ARE (Антиоксидант респонсивный элемент) [Зиновкин Р.А. и соавт., 2022]. Ферментами-маркерами активации транскрипционного фактора Nrf2 являются NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза и гемоксигеназа-1.

1.2.1 Антиоксидант респонсивный элемент

ARE представляет собой цис-действующий элемент ДНК, содержащий последовательность 5'-TTGACnnGC-3', расположенную с 5'-конца на расстоянии

двух пар нуклеотидов от «ядра». Длина функционально активных ARE составляет 16 нуклеотидов, 5 из которых являются вариабельными нуклеотидами для создания условий для разнообразия генов (Рисунок 11А) [Ткачев В.О. и соавт., 2011]. Посредством ARE происходит модуляция транскрипции генов путем связывания транскрипционных факторов основного домена и лейциновой молнии bZip (basic region and leucine zipper), наиболее вероятным из которых является Nrf2 [Ulasov A.V. et al., 2022]. Некоторые гены, например ген ГО-1 (*Hmox1*), содержат в своих промоторах несколько ARE-последовательностей, что делает возможным гибкую регуляцию экспрессии в ответ на внешние воздействия [Hayes J.D. et al., 2014].

1.2.2 Ядерный фактор 2-родственный эритроидному фактору 2

Nrf2 представляет собой высококонсервативный фактор транскрипции с базовой структурой лейциновой молнии и принадлежит к семейству регуляторных белков Cap-n-Collar. Nrf2 у разных видов содержит семь высококонсервативных доменов - Neh1-7 (Рисунок 11Б). Neh1 представляет собой гидрофобный домен типа лейциновой молнии bZip, отвечающий за димеризацию с белками-партнерами - Maf и Jun, и связывание с ARE [Hayes J.D. et al., 2014]. N-концевой домен Neh2 участвует в редокс-зависимой регуляции стабильности белка путем взаимодействия с Keap1 и конъюгации с убиквитином [Zhang D.D. et al., 2006]. Домены Neh3, Neh4 и Neh5 опосредуют трансактивирующее действие Nrf2, взаимодействуя с внутриклеточными коактиваторными молекулами [Zhang J. et al., 2007; Ohta K. et al., 2007; Nioi P. et al., 2005]. Домен Neh6 обеспечивает независимую от Keap1 регуляцию, в условиях окислительного стресса содержит редокс-независимый дегрон для убиквитинирования Nrf2 [Cuadrado A. et al., 2018]. Домен Neh7 также регулирует активность Nrf2, связывая рецептор ретиноевой кислоты α , ядерный рецептор, который подавляет активность Nrf2 [Wang H. et al., 2013]. Кроме того, молекула белка Nrf2 содержит три последовательности ядерной локализации - NLS и две последовательности

ядерного экспорта - NES, которые регулируют перемещение транскрипционного фактора в клеточное ядро либо в цитоплазму [Li W. et al., 2006; Jain A.K. et al., 2005]. Nrf2 имеет низкое содержание в цитоплазме из-за его быстрой деградации с периодом полураспада менее 20 мин [Sihvola V. et al., 2017].

1.2.3 Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1

Keap1 основной внутриклеточный регулятор Nrf2, характеризуется пятью доменами (Рисунок 11В), то есть тремя широкими комплексами-трамплинами (ВТВ), одной промежуточной областью (IVR) и двумя глициновыми повторными доменами (DGR), каждый из которых важен для ингибирования активности Nrf2. [Bellezza I. et al., 2018].

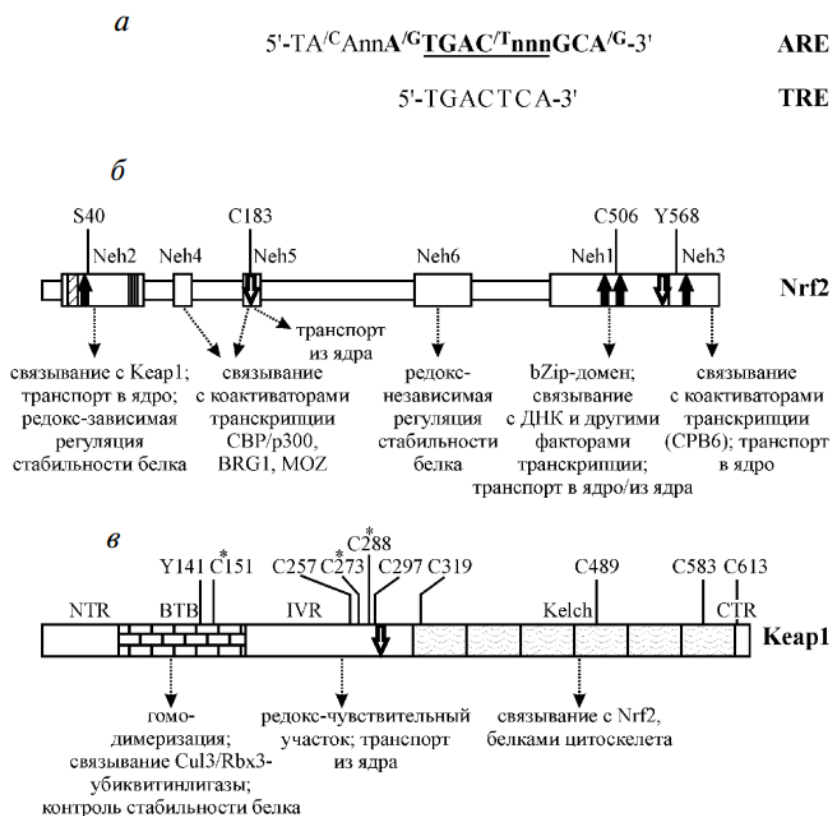


Рисунок 11 – Структура ARE (А), человеческих белков Nrf2 (Б) и Keap1 (В) [Ткачев В.О. и соавт., 2011]

В физиологических условиях Keap1 считается негативным регуляторным белком Nrf2. Мотивы DLG и ETGE в одной молекуле Nrf2 связываются с доменами DGR гомодимера Keap1, а спиральная конформация между EGTE и DLG убиквитинируется лигазным комплексом Cul3-Rbx1-E3 и расщепляется протеасомой 26S [Li X. et al., 2018; Zhou Y. et al., 2019]. В условиях окислительного или электрофильного стресса область VTB Keap1 действует как сенсор. Keap1 непосредственно окисляется или фосфорилируется редокс-чувствительной протеинкиназой с высвобождением Nrf2, ингибирует убиквитинирование Nrf2 и предотвращает его деградацию [Dinkova-Kostova A. T. et al., 2017; Zhu C. et al., 2017]. Накопленный Nrf2 переносится в ядро для связывания с белком sMaf и ARE для инициации транскрипции [Li C. et al., 2018]. После восстановления баланса Keap1 входит в ядро и переносит Nrf2 в ядро для убиквитинированной деградации [Zhu J. et al., 2016].

В настоящее время известны два способа регуляции сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE: Keap1-зависимый и Keap1-независимый [Bryan H. K. et al., 2013]. К первому относятся три модели регуляции - «модель петли и защелки», «модель разделения Keap1-CUL3» и «убиквитинирование Keap1». Также имеются данные, что Nrf2 может регулироваться независимо от Keap1: транскрипционная регуляция и саморегуляция Nrf2, посттранскрипционная регуляция, фосфорилирование и убиквитинирование протеинкиназ, связывание с другими белковыми молекулами и факторами транскрипции [Zhou Y. et al., 2019].

Окислительный стресс связан со многими патологическими состояниями, и накопление АФК играет ведущую роль в прогрессировании воспалительных реакций. Полагают, что увеличение внутриклеточных АФК приводит как к окислению Keap1, так и к высвобождению Nrf2 из комплекса [Stohs S. J. et al., 2012]. В исследованиях [Lee J.M. et al., 2003] было показано, что нейроны в смешанной системе культур с нокаутом Nrf2 были более чувствительны к апоптозу. Активность NADPH-оксидаз повышается в клетках эмбриональных фибробластов с дефицитом Nrf2, а неограниченная активация Nrf2 в фибробластах, нокаутированных по Keap1, приводила к снижению продукции

АФК митохондриями и цитозольной NADPH-оксидазной системой [Kovac S. et al., 2015]. Также в клетках с дефицитом Nrf2 снижается мембранный потенциал митохондрий, в то время как активация Nrf2 приводит к его повышению [Holmström K. M., et al., 2013; Strom J. et al., 2016]. Через индукцию экспрессии генов ГО-1 и XR, Nrf2 способен поддерживать функцию митохондрий [Kwon J. et al., 2012; Athale J. et al., 2012]. Вероятно, ГО-1 может транслоцироваться в митохондрии, и такая локализация соответствует снижению продукции оксидантов [Bindu S. et al., 2011; Bolisetty S. et al., 2013].

1.2.4 НАД(Ф)Н:хинооксидоредуктаза

XR (менадионредуктаза, ДТ-диафораза) представляет собой флавопротеин, катализирующий исключительно двухэлектронное опосредованное восстановление хинонов до гидрохинонов [Ross D. et al., 2017]. Эта каталитическая реакция конкурирует с реакцией одноэлектронного восстановления, катализируемой редуктазами цитохрома P450, которая генерирует высокореакционноспособные семихиноны и дальнейшую генерацию АФК [Saha S. et al., 2020]. Кроме того, XR также поддерживает восстановленную форму CoQ9 и CoQ10, тем самым защищая плазматическую мембрану от перекисного окисления липидов. XR обнаружена в тканях практически всех видов животных [Zhang K. et al., 2018], синтезируется в разных количествах в большинстве тканей растений. В клетке главным образом локализована в цитозоле (около 90%). Основная функция фермента - детоксикация хинонов и их производных [Ross D. et al., 2017].

В структуре генов XR существуют два элемента, играющие важную роль в активации синтеза фермента: ARE-элемент (антиоксидант-чувствительный элемент) и XRE-элемент (ксенобиотик-чувствительный элемент) [Ross D. et al., 2021; 2017]. Важно отметить, что индукция XR отсутствовала как у AhR-нокаутных мышей, так и у мышей с нокаутом Nrf2 [Yeager R. L. et al., 2009; Lu H. et al., 2011]. Сходные результаты, касающиеся активации XR, были получены у

мышей нокаутных по Nrf2^{-/-} после воздействия лиганда AhR 3-метилхолантрена [Noda S., et al., 2003].

1.2.5 Гемоксигеназа-1

ГО-1 является скорость-лимитирующим ферментом, способным катализировать расщепление гема на биливердин, монооксид углерода (СО) и железо [Johmura Y. et al., 2021].

Гемоксигеназа была обнаружена в конце 1960-х годов в микросомах селезенки, почек, печени крыс [Tenhunen R. et al., 1968]. В дальнейшем были определены три изоформы гемоксигеназы: ГО-1, ГО-2 и ГО-3, родственные белку HSP32 [Cruse I. et al., 1988]. ГО-1 – белок с молекулярной массой 32 кДа, который активируется в ответ на окислительный стресс [Shibahara S. et al., 2003], в то время как ГО-2 представляет собой конститутивно экспрессируемый в некоторых клетках белок с молекулярной массой 36 кДа и практически не индуцируется [He J.Z. et al., 2010; Loboda A., et al., 2015]. Третья изоформа – ГО-3 до сих пор считается псевдогеном гена ГО-2 [Scaragnini G. et al., 2002].

Белок ГО-1 изначально был обнаружен в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), и карбокси-концевые 22 основания в структуре белка были названы последовательностью, заякоренной в ЭР. Белок ГО-1 фиксируется на мембране ЭР через участок TMS, а большая часть оставшейся структуры белка обращена к цитоплазме для связывания с гемом. Было обнаружено, что при стрессе или патологических условиях ГО-1 локализуется в других субклеточных компартментах, включая плазматическую мембрану, митохондрии и ядро [Dunn L.L. et al., 2014]. Так ГО-1 связывается с мембранным белком кавеолином (CAV) и располагается в кавеолах - специализированных микродоменах на плазматической мембране [Kim H.P. et al., 2004; Jung N.H. et al., 2003]. Несмотря на то, что белок ГО-1 связывается с CAV-1, активность фермента снижается, но это дает возможную основу для активного внеклеточного переноса белка ГО-1. Converso D.P et al. впервые продемонстрировали, что белок ГО-1 локализуется и

экспрессируется в митохондриях [Converso D.P. et al., 2006]. Удаление N-концевого ЭР-таргетированного домена ГО-1 увеличивало транслокацию белка в митохондрии [Bansal S. et al., 2014].

Биологическая активность ГО-1 в основном сосредоточена на его ферментативной активности. Он является первым лимитирующим ферментом, который расщепляет гем до свободного железа, монооксида углерода (СО) и биливердина. СО в физиологических и патологических условиях играет роль в защите клеток и передаче сигналов, включая апоптоз, пролиферацию клеток, воспаление и иммунную регуляцию [Chora A.A. et al., 2007; Ryter S.W. et al., 2016]. Свободное железо необходимо для синтеза ферритина и гемоглобина [Gozzelino R. et al., 2010]. Под действием биливердин-редуктазы биливердин превращается в билирубин, который соединяется с UDP-глюкуронитрансферазой и выделяется с желчью [Martínez-Casales M. et al., 2021]. Тем самым ГО-1 выполняет функцию антиоксидантного фермента – с одной стороны, удаляет из клетки гем, который является потенциальным прооксидантом и при концентрации выше 1 мкМ становится эффективным генератором АФК, а с другой - увеличивает количество билирубина, обладающего антиоксидантными свойствами [Турпаев 2013, Ляхович 2006, Yachie A., 2021].

В последнее время многочисленные доказательства указывают на то, что ГО-1 может обладать другими физиологическими функциями, которые не связаны с его ферментативной активностью. Так называемые «неканонические функции» [Dunn L.L. et al., 2014; Wu J. et al., 2021; Jagadeesh A.S.V. et al., 2022], среди которых двумя наиболее специфическими являются ядерная локализация ГО-1 и белок-белковое взаимодействие. Например, белок ГО-1 может связываться и транспортировать комплекс Nrf2, который мигрирует в ядро, что может способствовать стабилизации Nrf2 [Rada P. et al., 2012; Chowdhry S. et al., 2013; Biswas C. et al., 2014, Yang Q. et al., 2022]. Эти исследования показали, что ядерная локализация ГО-1 также может способствовать защите от окислительного стресса.

Проведенный анализ литературных источников свидетельствует об интенсивном накоплении данных о разнообразных регуляторных биологических свойствах отдельных БАВ полифенольной и индольной природы и молекулярных механизмах их действия. Вместе с тем, имеются лишь единичные сведения об эффектах БАВ при совместном пероральном поступлении в организм. В связи с этим, изучение влияния при раздельном и сочетанном поступлении БАВ пищи – приоритетных полифенолов различных классов, таких как кверцетин, рутин, куркумин, ресвератрол, гесперидин, эпигаллокатехингаллат, и представителя индольных соединений - индол-3-карбинола на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов является актуальным и имеет как теоретическое, так и практическое значение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

В работе использовали крыс-самцов Вистар, полученных из питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». В каждом эксперименте крысы были разделены на однородные группы – контрольную и опытные, согласно плану исследования. Крыс содержали в клетках по 2-3 особи в каждой в условиях искусственного освещения (12-ти часовой цикл день/ночь) при температуре 20-25⁰С и относительной влажности воздуха 60-80% на подстилке из древесных стружек. Наблюдение за состоянием животных и учет поедаемости полусинтетического рациона проводили ежедневно, определение массы тела – 1 раз в 2 дня. По завершении каждого эксперимента животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Исследования на животных выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в Национальных стандартах РФ ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33216—2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004 г). Дизайн планируемых в диссертационной работе исследований на лабораторных животных был одобрен Комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (протокол №1 от 29.01.2014).

2.2 Условия экспериментов

В экспериментах был использован полусинтетический рацион на основе AIN93M (таблица 1). В состав рационов в зависимости от поставленных задач

исследования включали рутин (Sigma, R5143), гесперидин (Sigma, H5254), кверцетин (Sigma, Q4951), транс-ресвератрол (DSM, resVida), индол-3-карбинол (SIGMA, I7256), эпигаллокатехингаллат (DSM, Teavigo), куркумин (АО «ЭКО РЕСУРС» 4010000768). Животные ежедневно получали рацион из расчета 15 г сухого корма на крысу, воду – в режиме неограниченного доступа. Крыс депривировали голодом за 16 часов до окончания эксперимента. Длительность экспериментов составляла 14 дней.

Эффекты отдельного и сочетанного поступления БАВ в организм изучали у интактных животных, включая в состав рациона крыс отдельно и в комбинации следующие соединения: рутин и гесперидин в количестве, обеспечивающем дозу 400 мг/кг м.т. (раздел 3.1); кверцетин и ресвератрол в количестве, обеспечивающем дозу 100 мг/кг м.т. (раздел 3.2); куркумин и кверцетин в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т. (раздел 3.3); индол-3-карбинол и эпигаллокатехингаллат в количестве, обеспечивающем дозу 50 мг/кг м.т. и 200 мг/кг м.т., соответственно (раздел 3.4).

На модели окислительного стресса, индуцированного CCl_4 , было изучено отдельное и сочетанное действие следующих БАВ: рутина и гесперидина в количестве, обеспечивающем дозу 400 мг/кг м.т. (раздел 4.1); куркумина и кверцетина в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т. (раздел 4.2).

Таблица 1 – Состав полусинтетического рациона

Компонент	Содержание, г/кг
Казеин	200,0
Крахмал кукурузный	600,5
Масло подсолнечное	50,0
Лярд (свиной жир)	50,0
Целлюлоза микрокристаллическая	50,0
Солевая смесь ¹	35,0
Витаминная смесь ²	10,0
L-цистеин	2,0
Холин хлорид (60% холина)	2,5

Примечание – ¹ – Состав указан в таблице 2; ² – состав указан в таблице 3

Таблица 2 – Состав солевой смеси

Компонент	Содержание, г/кг
Кальций углекислый, безводный	357
Калий фосфорнокислый, одноосновный	250
Натрий хлористый	74,0
Калий сернокислый	46,6
Калий лимоннокислый, моногидрат	28,0
Магния оксид	24,0
Железо лимоннокислое	6,06
Цинк углекислый	1,65
Марганец углекислый	0,63
Медь углекислая	0,30
Калия йодат	0,01
Натрия селенат, безводный	0,01025
Аммония парамолибдат, 4-водный	0,00795
Натрия метасиликат	0,63
Хромокалиевые квасцы, 12-водные	0,275
Борная кислота	0,0815
Натрий фтористый	0,0635
Никель углекислый	0,0318
Литий хлористый	0,0174
Аммония ванадат	0,0066
Сахароза	210,626

Таблица 3 – Состав витаминной смеси

Компонент	Содержание, г/кг
Никотиновая кислота (B ₃)	3,0
Пантотенат кальция (B ₅)	1,6
Пиридоксина гидрохлорид (B ₆)	0,7
Тиамин гидрохлорид (B ₁)	0,6
Рибофлавин (B ₂)	0,6
Фолиевая кислота (B ₉)	0,2
D-биотин (B ₇)	0,02
Цианкобаламин (B ₁₂)	0,0025
Менадион (витамин K ₁)	0,075
Витамин А (Dry Vitamin A Acetate, DSM, 500 000 ME/г)	0,8
Витамин D ₃ (холекальциферол, Dry Vitamin D ₃ , DSM, 100 000 ME/г)	1,0
Витамин Е (Dry Vitamin Е 50% - dl-alpha-tocopheryl acetate, DSM, 500 ME/г)	8,0
Сахароза	983,4025

Для исследования влияния БАВ в условиях окислительного стресса использовали модель токсического поражения печени четыреххлористым углеродом. Для этого за 24 ч до окончания эксперимента животным опытных групп однократно внутрибрюшинно вводили CCl_4 в виде раствора в оливковом масле в количестве 2 мл/кг м.т.: 50% раствор - при использовании дозы CCl_4 1,0 мл/кг м.т. и 25% раствор – при дозе CCl_4 0,5 мл/кг м.т. Крысам контрольной группы вводили равное количество масла – 2 мл/кг м.т.

2.3 Подготовка материала для исследований (выделение фракций печени)

Для оценки **активности ферментов** выделение цитозольной и микросомальной фракций печени осуществляли с использованием метода [Lake B.G., 1987]. У животных после выведения из эксперимента извлекали печень, промывали в охлажденном 1,15% растворе KCl, просушивали при помощи фильтровальной бумаги, измельчали продавливанием через перфорированную металлическую пластинку с диаметром отверстий 0,8 мм и гомогенизировали навеску в 0,05 М Трис-HCl буфере pH 7,4 на 1,15% KCl в соотношении 1:4 (масса:объем). Печень гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейма с тefлоновым пестиком в течение 90 с при 1200 об/мин. Гомогенаты центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант отбирали и подвергали повторному центрифугированию при 105000 g в течение 60 мин. Отделяли надосадочную жидкость (цитозольную фракцию); осадок (микросомальную фракцию) ресуспендировали в 0,05 М Трис-HCl буфере pH 7,4 в соотношении 1:2.

Для оценки **экспрессии белков** выделяли ядерную и цитоплазматическую фракции печени следующим образом. Ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейма с тefлоновым пестиком в трехкратном объеме раствора 0,25М сахарозы и 0,001М ЭДТА, pH 7,2-7,4 при 1200 об/мин в течение 90 с. Для освобождения от не разрушившихся клеток гомогенат центрифугировали при 100 g в течение 5 мин. Полученный надосадок переносили в чистые пробирки и центрифугировали при 1000g в течение 10 мин. Осадок

дважды ресуспендировали на вортексе Microspin FV-2400, Biosan в течение 15 сек в трехкратном объеме буфера и центрифугировали при 600 g в течение 10 мин. Объединенные надосадки после каждого центрифугирования составили цитоплазматическую фракцию. Ядерную фракцию получали путем ресуспендирования осадка в четырехкратном объеме буфера при 900 об/мин в течение 60 с. Полученные фракции смешивали с равным объемом 2-кратного буфера образца (100мМ ТрисHCl (pH 6,8), 20% глицерин, 4% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 200 мМ β-меркаптоэтанол, 0,2% бромфеноловый синий) и нагревали при 95 °С в течение 4 минут в термостате TDB- 120 Biosan.

Все работы проводили при температуре +4°С, полученные цитозольную и микросомальную фракции хранили при -20 °С, ядерную и цитозольную фракции – при -80 °С до исследования.

2.4 Методы биохимических исследований

2.4.1 Определение содержания белка

Общее содержание белка в ядерной и цитозольной фракциях определяли по методу Брэдфорда с использованием коммерческого реагента согласно инструкции производителя (Sigma-Aldrich, США). Для построения калибровочного графика использовали бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США).

2.4.2 Определение активности гемоксигеназы-1

Определение активности ГО-1 проводили по методу [McNally S.J., 2004]. Реакционную смесь общим объемом 700 мкл, содержащую 0,1 М калиевый фосфатный буфер (pH 7,4), 2 мМ MgCl₂, 50 мкМ гемина, 2 мМ глюкозо-6-фосфата, 0,35 Ед. глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, 0,8 мМ НАДФН, 70 мкл цитозольной фракции (~0,9 мг белка) и 100 мкл микросомальной фракции печени (~0,8 мг белка), инкубировали в течение 60 мин при 37⁰С в темноте. После остановки реакции 200 мкл хлороформа смесь центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g. Далее измеряли оптическую плотность хлороформной фракции

при $\lambda=460$ нм с коррекцией на $\lambda=530$. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции образовавшегося в результате реакции билирубина $\epsilon=40$ $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$.

2.4.3 Определение активности NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы

Активность ХР в печени проводили по методу [Benson A.M., 1980]. 0,1 мл цитозольной фракции, предварительно разведенной 1:29 в 0,05 М Трис-НСl буфере (рН 7,4), вносили в реакционную среду общим объемом 3 мл, содержащую 0,05 М Трис-НСl буфер (рН 7,4), 0,7 мг альбумина, 0,2 мМ НАДФН, 5 мкМ ФАД, 0,01% Твин-20, 40 мкМ ДХИФ. Далее отмечали изменение оптической плотности при $\lambda=600$ нм в течение 1 мин при 25⁰С. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции 2,6-дихлориндофенола $\epsilon=2,1*10^4$ $\text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$.

2.5 Определение содержания мРНК β -актина (*Actb*), гемоксигеназы-1 (*Hmox1*), NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы (*NQO1*) и транскрипционного фактора Nrf2 (*Nrf2*)

Экспрессию генов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ) в режиме реального времени. При подготовке к проведению ОТ выделяли из печени общую РНК по методу [Chomczynski P., 1987] с помощью реагента TRI REAGENT (Sigma-Aldrich, США). Метод основан на экстракции РНК в водную фазу из образца ткани. Ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Эльвейма с тефлоновым пестиком в 1 мл TRI REAGENT, инкубировали 15 мин при комнатной температуре для полного разрушения ядерно-белковых комплексов. Затем добавляли 200 мкл хлороформа и встряхивали на вортексе Microspin FV-2400, Biosan в течение 15 сек, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, центрифугировали на центрифуге Centifuge 5417R, Eppendorf при 16 000 об/мин в течение 15 мин при 4⁰С. Отбирали ≈ 600 мкл водной фазы, содержащей РНК, в новые пробирки и добавляли 500 мкл изопропанола, аккуратно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре на 10 мин, после чего

центрифугировали при 16 000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Образовавшийся осадок РНК промывали 2-3 раза 75%-м C₂H₅ОН и центрифугировали в 1 мл C₂H₅ОН при 9800 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Полученные образцы РНК хранили при -20°C.

Определение концентрации РНК, проведение реакции обратной транскрипции и ПЦР проводили в ПЦР-боксе DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S, Biosan. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Для проведения обратной транскрипции готовили смесь общим объемом 25 мкл, состоящую из 5 мкл 5-кратного буфера для M-MuLV обратной транскриптазы (СибЭнзим, Россия), 5 мкл смеси дезоксинуклеотид-трифосфатов (2,5 мМ каждый) (СибЭнзим, Россия), 4 мкл 83 мкМ oligo(dT)-праймера (Литех, Россия), 4,57 мкл DEPC-воды (Thermo Scientific, США), 0,63 мкл (25Е) ингибитора РНКаз RiboLock (Thermo Scientific, США), 0,8 мкл (160Е) M-MuLV обратной транскриптазы (СибЭнзим, Россия) и 5 мкл РНК (0,4 мкг/мкл). Реакцию ОТ проводили на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США) при 37°C в течение 1 часа. Полученную в реакции обратной транскрипции комплементарную ДНК (кДНК) использовали для оценки экспрессии генов *NQO1*, *Hmox1*, *Nrf2* и *Actb* методом ПЦР в режиме реального времени. Реакционная смесь для ПЦР общим объемом 25 мкл содержала 12,5 мкл 2-кратного iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) (100 мМ КСl, 40 мМ Трис-НСl рН 8,4, 0,4 мМ дезоксинуклеотид-трифосфаты, 50 ед/мл iTaq ДНК-полимераза, 6 мМ MgCl₂, интеркалирующий краситель SYBR Green I, 20 нМ флюоресцеин и стабилизаторы), по 2,5 мкл прямого и обратного праймеров к исследуемому гену (концентрация праймеров 1 ОЕ/мл) (Литех, Россия), 5 мкл воды без нуклеаз (Thermo Scientific, США) и 2,5 мкл кДНК в разведении 1/10. Последовательность праймеров представлена в таблице 4.

Аmplификацию проводили на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США). Реакцию ПЦР для всех изучаемых генов проводили по следующей схеме: активация iTaq ДНК-полимеразы при 95°C в течение 3 мин; 40 циклов, каждый из которых состоял из денатурации при 95°C в течении 15 с для *Actb* и *Nrf2*; 20 с - *NQO1* и 5 с

- *Hmox1*, отжига праймеров (58°C, 15 с для *Actb*; 58°C, 20 с - *Nrf2*; 60°C, 30 с - *NQO1*, *Hmox1*) и синтеза продукта при 72°C в течение 45 с – для *Actb*, 27 с - *Nrf2*; 30 с - *NQO1* и 10 с - *Hmox1*; после окончания циклов проводили контроль специфичности праймеров с помощью анализа кривой плавления (melt curve) в диапазоне 50-95°C (шаг 0,5°C по 10 с каждый).

Таблица 4 – Нуклеотидная последовательность праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров
<i>Actb</i>	F CGTTGACATCCGTAAGACCTC R TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT
<i>Hmox1</i>	F ACCCCACCAAGTTCAAACAG R GAGCAGGAAGGCGGTCTTAG
<i>NQO1</i>	F GTGAGAAGAGCCCTGATTGT R CCTGTGATGTCGTTTCTGGA
<i>Nrf2</i>	F GACCTAAAGCACAGCCAACACAT R CTCAATCGGCTTGAATGTTTGTC

Уровни экспрессии изучаемых генов нормализовали относительно уровня экспрессии гена сравнения *Actb* и рассчитывали по значению порогового цикла (C_t – cycle threshold) с использованием программы «Relative expression software tool» (REST) v.2.0.13 (Qiagen, Германия).

2.6 Определение содержания специфических белков: β -актина (актин), глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), гемоксигеназы-1 (ГО-1), NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы (ХР) и транскрипционных факторов Nrf2 и SP-1

В цитоплазматической фракции определяли содержание белков ГО-1, ХР, Nrf2, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), актина; в ядерной – уровень белка Nrf2 и SP-1. Общее содержание белка в пробах определяли по методу Брэдфорда с использованием коммерческого реагента согласно инструкции

производителя (Sigma-Aldrich, США). Образцы ядерной и цитоплазматической фракции, смешанные с 2-кратным буфером образца разводили до концентрации 10 и 20 мкг белка, соответственно, 1-кратным буфером образца, после чего нагревали при 95°C в течении 4 минут. Полученные пробы подвергали электрофоретическому разделению в 10% полиакриламидном геле при 200В в течение 50 мин (Mini-Protean Tetra Cell, Bio-Rad, США) и переносили на поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану при 20В в течение 30 мин (Trans-Blot SD Cell, Bio-Rad, США). Мембраны инкубировали в 5% растворе обезжиренного сухого молока (Bio-Rad, США) в TTBS буфере (Bio-Rad, США) в течение 50 мин при комнатной температуре, затем оставляли на ночь при 4°C в растворе соответствующих антител в TTBS буфере (разведение Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, США) - 1/100, SP-1 (Sigma-Aldrich, США) - 1/250, ГО-1 (Sigma-Aldrich, США) - 1/100, XP (Sigma-Aldrich, США) - 1/400, ГАФДГ (Sigma-Aldrich, США) - 1/10000, актина (Sigma-Aldrich, США) - 1/250). После пятикратного промывания в TTBS буфере мембраны обрабатывали раствором IgG-HRP (Bio-Rad, США) (разведение 1:3000) и StrepTactin-HRP (Bio-Rad, США) (разведение 1:20000) в TTBS буфере в течение 45 мин при комнатной температуре. После шестикратного промывания в TTBS буфере мембраны обрабатывали в течение 5 мин смесью субстратов Immun-Star HRP (Bio-Rad, США) и далее оценивали интенсивность хемилюминесценции на системе геле-документирования ChemiDoc XRS (Bio-Rad, США) с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, США). При этом уровни экспрессии белков Nrf2, XP и ГО-1 нормализовали относительно уровня экспрессии белков сравнения: актина, ГАФДГ и SP-1.

2.7 Методы статистической обработки экспериментальных данных

Статистический анализ данных выполняли с использованием компьютерной программы IBM SPSS Statistic 20 (Statistical Package for Social Sciences, США), согласно данным описательной статистики (M - среднее арифметическое, Me - медиана, Sd - стандартное отклонение, m – стандартная ошибка среднего), критерию ANOVA (в целях оценки однородности распределения показателей в

группах) и критерию Крускала-Уоллиса (односторонний дисперсионный анализ, для проверки равенства медиан нескольких выборок), тесту Стьюдента и непараметрическому тесту Манна-Уитни. Различия между группами животных признавали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИНОРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПИЩИ – АНТИОКСИДАНТОВ, НА АКТИВНОСТЬ, ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА И ГЕНА NRF2-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИХ РАЗДЕЛЬНОМ И СОЧЕТАННОМ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ

3.1 Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм

Целью исследований этого раздела являлось изучение влияния Р и Гес на активность, экспрессию белка и гена ГО-1 и ХР и на экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс при раздельном и сочетанном поступлении в организм. Результаты исследования представлены в [Балакина А.С. и соавт., 2016; Балакина А.С. 2017, 2022].

Исследования проводили на 4-х группах крыс-самцов линии Вистар по 8 особей в каждой. Крысы контрольной группы в течение 14 дней получали стандартный полусинтетический рацион, крысы 1-й опытной группы – тот же рацион с включением Р («Sigma-Aldrich», США) в количестве, обеспечивающем дозу 400 мг/кг м.т., животные 2-й опытной группы получали рацион с включением Гес («Sigma-Aldrich», США) в том же количестве, крысы 3-й опытной группы – рацион, содержащий Р и Гес в количестве, обеспечивающем дозу 400 мг/кг м.т. каждого. Животные получали питьевую воду без ограничений и корм ежедневно в одно и то же время в режиме свободного доступа из расчета 15 г сухого корма на крысу. Контроль за поедаемостью корма и состоянием животных проводили ежедневно, контроль массы тела - через день.

Включение в рацион Р и Гес как по отдельности, так и совместно не оказывало влияния на общее состояние животных, массу тела и относительную массу печени (Таблица 5).

Таблица 5 – Масса тела и относительная масса печени у крыс контрольной и опытных групп

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +рутин	2-я опытная, +гесперидин	3-я опытная, +рутин +гесперидин
Масса тела, г				
исходная	224±4	224±4	225±5	224±4
конечная	282±6	284±7	284±5	284±7
Относительная масса печени, %	3,41±0,14	3,19±0,15	3,26±0,10	3,14±0,10

У крыс, получавших рацион с Р или с Гес, обнаруживали умеренное возрастание активности ГО-1 – на 28% ($p < 0,05$) и на 24% ($p > 0,05$), соответственно (Таблица 6, Рисунок 12А). У животных, получавших Р вместе с Гес (3-я опытная группа) возрастание активности ГО-1 было менее выраженным, чем у крыс 1-й и 2-й опытных групп и превышало контрольный уровень на 16% ($p > 0,05$).

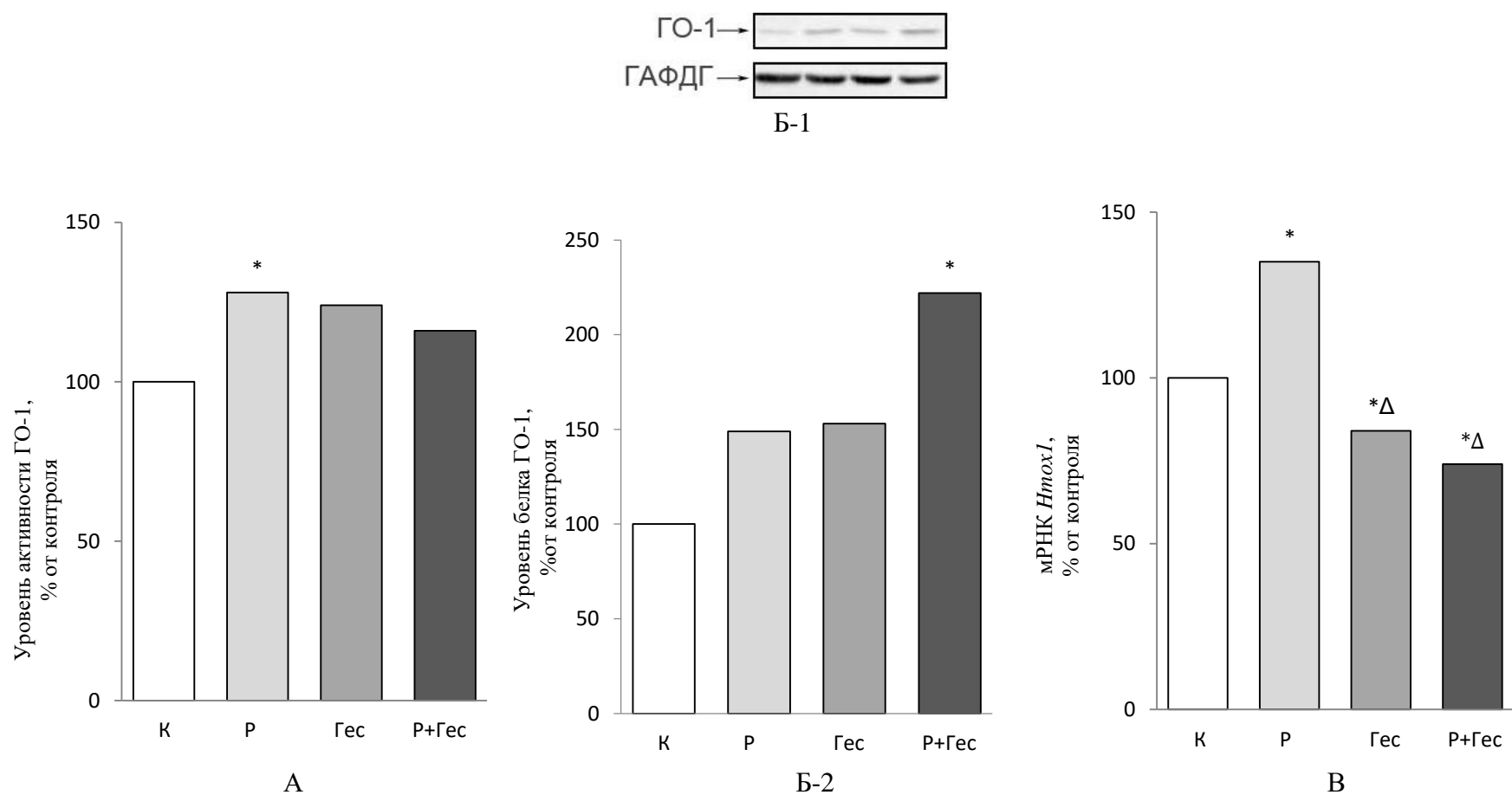
Результаты вестерн-блот анализа показали, что уровень белка ГО-1 в печени увеличивался в равной степени в 1,5 раза ($p > 0,05$) при введении Р или Гес в рацион, и более чем в 2 раза ($p < 0,05$) при их совместном введении (Таблица 6, Рисунок 12Б).

По данным ПЦР уровень мРНК *Htox1* в печени крыс, получавших рацион с Р, возрастал на 35% ($p < 0,05$) и практически не отличался от контрольного уровня у крыс, получавших рацион с Гес. Несмотря на возрастание количества белка ГО-1 при совместном включении в рацион Р и Гес, экспрессия мРНК *Htox1* достоверно снижалась - на 26% относительно контроля и на 45% относительно уровня мРНК *Htox1* в печени крыс, получавших только Р (Таблица 6, Рисунок 12В).

Таблица 6 – Влияние рутина и гесперидина на активность ГО-1, экспрессию белка ГО-1 и гена *Hmox1* при их раздельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +рутин	2-я опытная, +гесперидин	3-я опытная, +рутин +гесперидин
Активность ГО-1, мкмоль/мин•мг белка	7,36±0,23	9,45±0,60*	9,14±0,93	8,57±0,59
Уровень экспрессии белка ГО-1	16,3±1,3	24,3±3,5	25,0±2,5	36,3±9,6*
Уровень экспрессии гена <i>Hmox1</i>	1,000	1,347*	0,835* ^Δ	0,739* ^Δ

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - ГАФДГ, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (Р)

Рисунок 12 - Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2) и уровень мРНК *Hmox1* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии рутина и гесперидина

Включение в рацион Р (1-я опытная группа) вызывало увеличение активности ХР в печени крыс на 61% ($p < 0,05$), а Гес (2-я опытная группа) – на 28% ($p > 0,05$). При совместном воздействии Р и Гес (3-я опытная группа) активность ХР возрастала на 78% ($p < 0,05$) выше контроля, что превышало активность фермента у крыс 1-й (на 10%) и 2-й опытных групп (на 39%) (Таблица 7, Рисунок 13А).

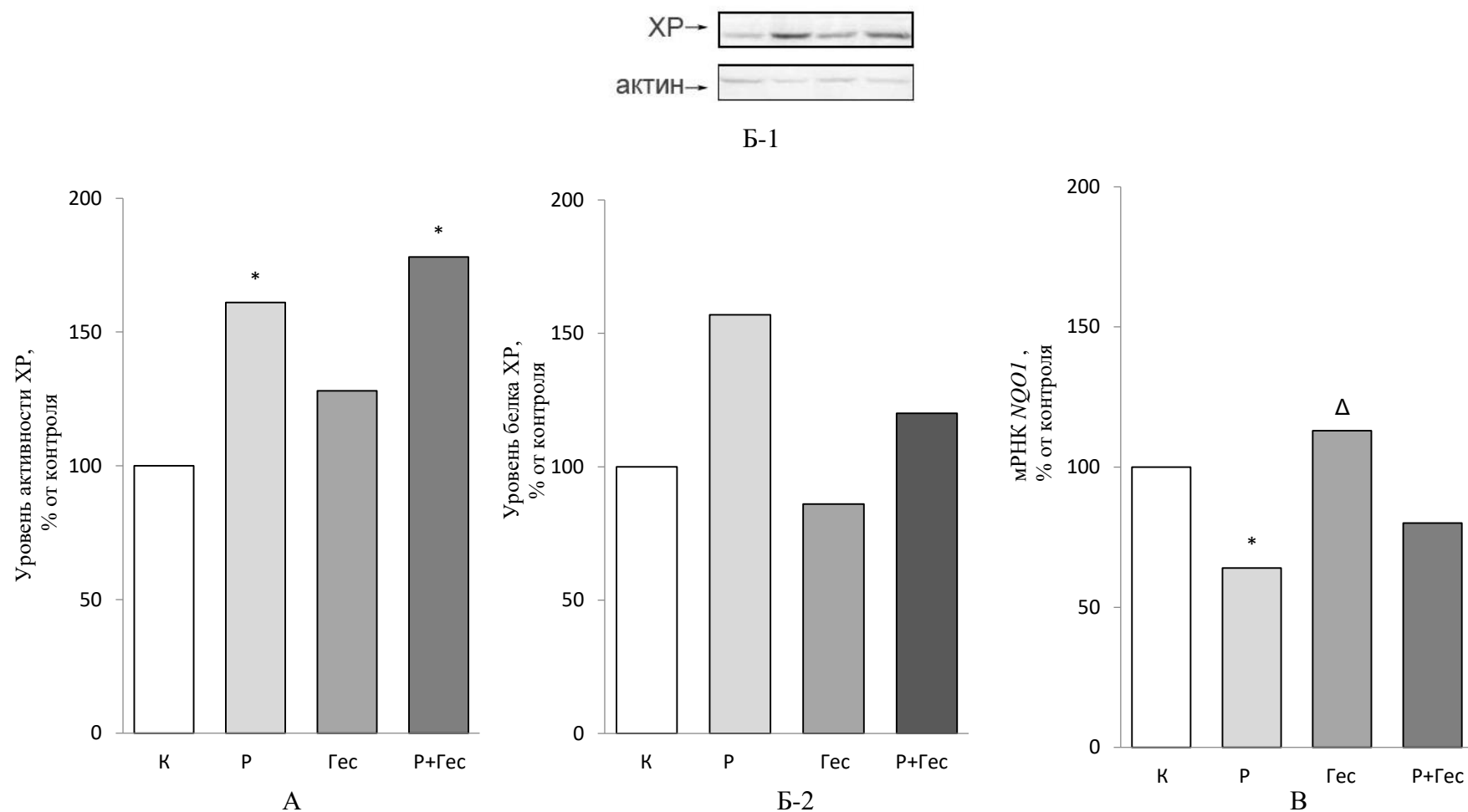
Содержание белка ХР в печени крыс возрастало на 57%, но статистически незначимо при действии Р. Не обнаруживалось существенного изменения уровня белка ХР (относительно контроля) у крыс, получавших с рационом Гес или Гес вместе с Р (Таблица 7, Рисунок 13Б).

Как видно из Таблицы 7 и Рисунка 13В содержание мРНК *NQO1* в печени крыс уменьшалось значимо на - 36% ($p < 0,05$) относительно контроля при включении в рацион Р, но не отличалось существенно от контрольного уровня у крыс, получавших Гес. При совместном действии Р и Гес уровень мРНК *NQO1* был ниже, чем у крыс контрольной группы на 20% ($p > 0,05$).

Таблица 7 – Влияние рутина и гесперидина на активность ХР, экспрессию белка ХР и гена *NQO1* при их отдельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +рутин	2-я опытная, +гесперидин	3-я опытная, +рутин +гесперидин
Активность ХР, мкмоль/ми•мг белка	0,18±0,02	0,29±0,04*	0,23±0,07	0,32±0,05*
Уровень экспрессии белка ХР	397±102	620±274	343±62	474±89
Уровень экспрессии гена <i>NQO1</i>	1,000	0,643*	1,127 ^Δ	0,800

Примечание –* - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (Р)

Рисунок 13 – Активность фермента XР (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка XР (Б-1) и относительное содержание белка XР (Б-2) и уровень мРНК *NQO1* (Б) в печени крыс при раздельном и совместном действии рутина и гесперидина

В ядерной фракции печени не было обнаружено каких-либо статистически значимых различий уровня белка *Nrf2* между группами. Так в 1-й опытной группе (рацион с Р) количество белка *Nrf2* было ниже контроля на 11%, во 2-й (рацион с Гес) – не отличалось от контрольного уровня и в 3-й (рацион с Р и Гес) было выше на 20% (Таблица 8, Рисунок 14А).

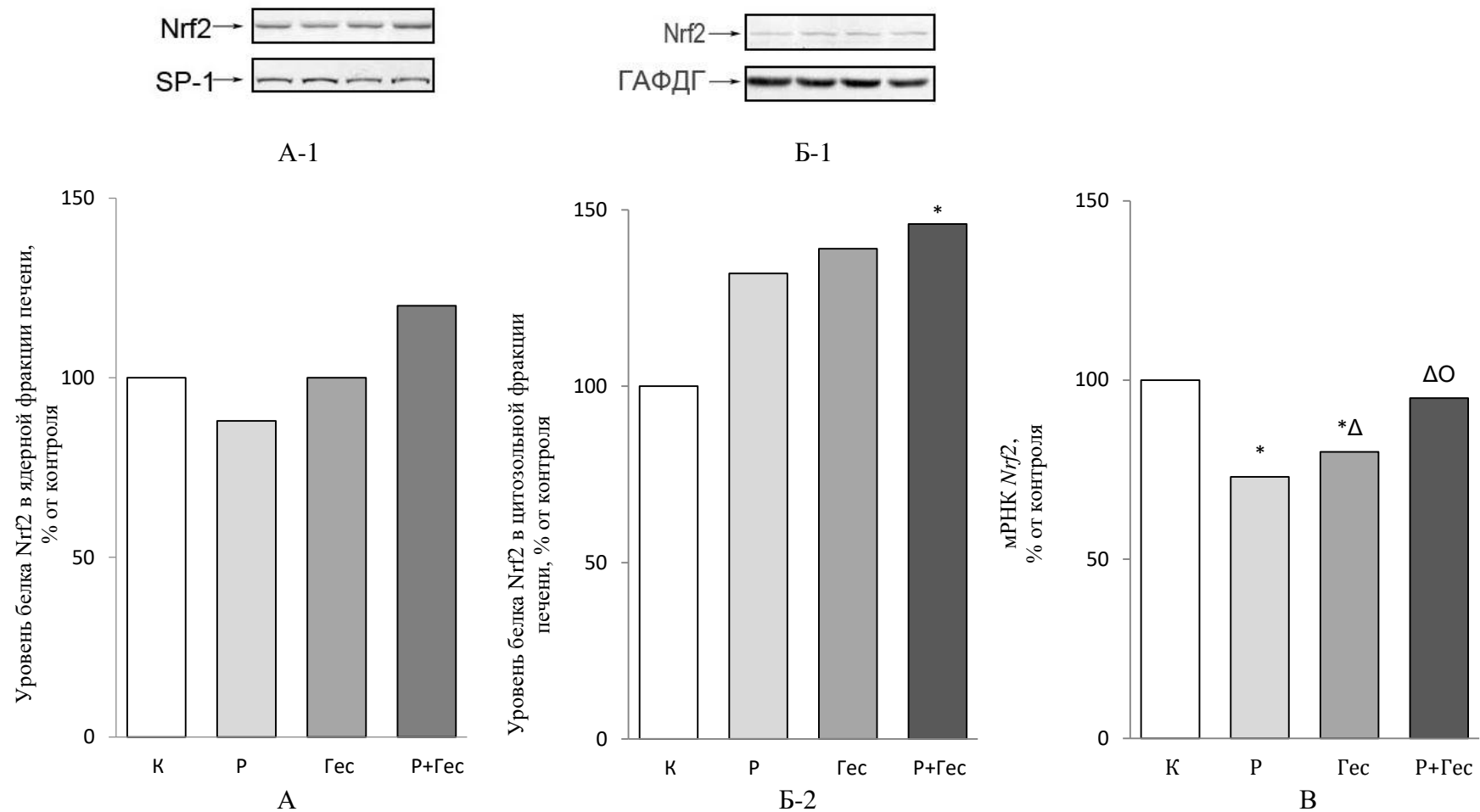
В то же время, во фракции цитозоля отмечалось недостоверное возрастание содержания белка *Nrf2* - у крыс, получавших Р, на 32% и у получавших Гес - на 40%. У получавших Р и Гес - содержания белка *Nrf2* увеличивалось на 46% ($p < 0,05$) относительно контроля (Таблица 8, Рисунок 14Б).

Как Р, так и Гес снижали незначительно, хотя и достоверно, уровень мРНК *Nrf2* в печени соответственно на 27% и 20%. При совместном действии Р и Гес уровень экспрессии мРНК *Nrf2* не отличался от контрольного и был достоверно выше уровня у крыс, получавших только Р (на 30%) и только Гес (на 19%) (Таблица 8, Рисунок 14В).

Таблица 8 – Влияние рутина и гесперидина на экспрессию белка *Nrf2* в ядерной и цитозольной фракциях и экспрессию гена *Nrf2* при их раздельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +рутин	2-я опытная, +гесперидин	3-я опытная, +рутин +гесперидин
Уровень экспрессии белка <i>Nrf2</i> в ядерной фракции печени крыс	131±15	116±17	130±4	158±13
Уровень экспрессии белка <i>Nrf2</i> в цитозольной фракции печени крыс	18,0±2,5	23,7±2,0	25,0±2,0	26,3±2,4*
Уровень экспрессии гена <i>Nrf2</i>	1,000	0,731*	0,795* ^Δ	0,947 ^{ΔO}

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, ^Δ - с 1-ой опытной группой, ^O - со 2-ой опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белков и гена в относительных единицах, уровни экспрессии изучаемых белков нормализовали по уровню экспрессии белков сравнения: SP1 в ядерной фракции печени крыс и ГАФДГ – в цитозольной, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*.



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (Кв), О - со 2-й опытной группой (Рес)

Рисунок 14 – Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракциях печени крыс и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракциях печени крыс и уровень мРНК *Nrf2* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии рутина и гесперидина

Таким образом, проведенные исследования показали, что даже высокие дозы Р и Гес не оказывают токсического или прооксидантного действия на крыс, что подтверждают данные других авторов [Кравченко Л.В. и соавт., 2015; Ускова М.А. и соавт., 2010; Kalender Y. et al., 2012]. Полученные результаты показали, что включение в рацион здоровых интактных крыс Р и, в меньшей степени, Гес вызывает возрастание активности и количества белка ГО-1. Важно отметить, что при совместном включении в рацион Р и Гес наблюдается аддитивность их действия на экспрессию белка ГО-1, но не на активность фермента. Наряду с этим только Р усиливает экспрессию гена *Hmox1*. Включение в рацион Р также увеличивает активность и уровень экспрессии белка ХР. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии выраженного влияния Р и Гес на экспрессию белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс и прослеживаются тенденции к увеличению экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции, причем при совместном введении Р и Гес увеличение наиболее выражено и достоверно отличается от контроля. Несмотря на умеренное снижение экспрессии гена *Nrf2* при включении в рацион Р или Гес, их комбинированное действие приводит к увеличению уровня мРНК *Nrf2* достоверно, относительно уровня у крыс, получавших только Р или Гес.

Способность Р и его агликона кверцетина индуцировать активность ГО-1 у здоровых интактных крыс показана лишь в единичных исследованиях. Так, дозозависимое возрастание активности ГО-1 обнаруживали у крыс, получавших с рационом Р в дозах 40 и 400 мг/кг м.т. [Кравченко Л.В. и соавт., 2015]. Длительное введение крысам кверцетина в количестве 100 мг/кг м.т. вызывало избирательное увеличение, более чем в 2 раза, активности ГО-1 в печени [Tang Y. et al., 2013]. В то же время в ряде исследований, проведенных как *in vivo*, так и *in vitro* с использованием разных линий клеток, показано, что в условиях окислительного стресса антиоксидантное и противовоспалительное действие Р и кверцетина связано непосредственно с их способностью индуцировать активность ГО-1 [Liu C.M. et al., 2015; Covas G. et al., 2013; Purdom-Dickinson S.E. et al., 2007].

Результаты изучения молекулярных механизмов индуцирующего действия кверцетина на активность ГО-1, полученные в исследованиях *in vitro*, свидетельствуют о том, что оно опосредовано, главным образом, активирующим влиянием кверцетина на транскрипционный фактор Nrf2. Так, в клетках нормальной печени человека L02 при индуцированном окислительном стрессе разной этиологии наблюдали усиление транслокации Nrf2 в ядро наряду с усилением экспрессии гена *Hmox1* [Ji L.L. et al., 2015]. Аналогично, в клетках злокачественной мезотелиомы кверцетин индуцировал экспрессию белка Nrf2 и гена *Nrf2*, усиливал его транслокацию в ядро, что сопровождалось индукцией экспрессии мРНК *Hmox1* и белка ГО-1 [Lee Y.J. et al., 2015].

Индуцирующее действие Р (400 мг/кг м.т.) на активность ХР при его включении в рацион крыс было показано в исследованиях Усковой М.А. с соавт. [Ускова М.А. и соавт., 2010]. Способность агликона Р кверцетина индуцировать активность фермента, экспрессию белка ХР и мРНК *NQO1* так же обнаружена *in vitro* на культурах клеток MCF-7 и HepG2 [Tanigawa S. et al., 2007, Valerio L.G. et al., 2001]. В этих же экспериментах *in vitro* получены доказательства связи индуцированной кверцетином активации ХР с усилением экспрессии гена и белка Nrf2.

В отличие от результатов, полученных *in vitro*, в настоящей работе не выявлена зависимость активирующего действия Р на ГО-1 и ХР от его влияния на фактор Nrf2 как на уровне экспрессии мРНК *Nrf2*, так и на уровне экспрессии белка Nrf2 в цитоплазме и ядерной фракции.

Значительно менее изученным остается влияние Гес на активность Nrf2-регулируемых ферментов. В исследованиях [Elavarasan J. et al., 2012] у старых крыс со сниженными (по сравнению с молодыми) показателями антиоксидантного статуса введение Гес в дозе 100 мг/кг м.т. в течение 90 дней восстанавливало уровень активности антиоксидантных ферментов миокарда до уровня у молодых крыс, что сопровождалось усилением экспрессии мРНК *Nrf2* и

белка Nrf2. При этом Гес не оказывал какого-либо влияния на изученные показатели у молодых крыс.

Наличие связи между индуцирующим действием Гес на активность ГО-1 и Nrf2 показано в работах, проведенных на клетках нормальной печени человека L02 [Chen M. et al., 2010, Chen M.C. et al., 2010]. В клетках, подвергавшихся действию H₂O₂ или трет-бутил гидропероксида, Гес усиливал транслокацию Nrf2 в ядро и индуцировал активность ГО-1 и экспрессию мРНК *Hmox* и ферментного белка. В исследованиях *in vitro* было показано индуцирующее действие на экспрессию белка ГО-1 Гесперетина – агликона Гес (Гесп), на обработанных липополисахаридом мышинных макрофагах [Ren H. et al., 2016].

В отличие от данных, полученных на клеточных культурах, в наших исследованиях у крыс, получавших Гес в течение 2 нед, выявлено небольшое возрастание активности ГО-1 и ХР при отсутствии существенного изменения экспрессии их генов и экспрессии гена и белка Nrf2.

Данные о комбинированном действии Р и Гес на активность ГО-1 и ХР и других антиоксидантных ферментов, так же как и сведения о взаимном влиянии этих флавоноидов на их биодоступность и метаболизм в организме, фактически отсутствуют. Полученные нами результаты показали, что совместное действие Р и Гес приводит к небольшому уменьшению индивидуальных эффектов Р и Гес на активность ГО-1 и экспрессию гена *Hmox1*. В отличие от ГО-1, активность ХР при совместном поступлении Р и Гес превышала активность фермента у крыс, получавших только Р или Гес, что можно оценить как аддитивность их эффектов. Это взаимодействие, однако, не прослеживалось на уровне экспрессии мРНК *NQO1* и белка ХР.

Таким образом можно заключить, что *in vivo* высокие, но нетоксичные дозы Р и Гес как при раздельном, так и при совместном включении в рацион здоровых интактных крыс не оказывали значительного влияния на экспрессию гена и белка транскрипционного фактора Nrf2 и что обнаруженное при этом возрастание активности ГО-1 и ХР не связано с усилением экспрессии гена *Hmox1* и гена

NQO1. Эти результаты отличаются от данных, полученных *in vitro*. Можно предположить, что наряду с различиями в действующих концентрациях *in vitro* и *in vivo*, важную роль играет тот факт, что, попадая в организм, Р и Гес быстро метаболизируются и в крови выявляют почти исключительно метаболиты - кверцетин и гесперитин [Тутельян В.А. и соавт., 2011, Manach С. et al., 1997, Matsumoto Н. et al., 2004], биологическая активность которых не изучена.

3.2 Изучение влияния кверцетина и ресвератрола на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм

Целью исследований данного раздела являлось изучение влияния Кв и Рес на активность, экспрессию белка и гена ГО-1 и ХР и на экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс при раздельном и сочетанном поступлении в организм. Результаты исследования представлены в [Авреньева Л.И. и соавт., 2016; Балакина А.С., 2022].

Исследования проводили на 4-х группах крыс-самцов линии Вистар (по 8 особей в каждой) с исходной массой тела 180-200 г. Крысы контрольной группы в течение 14 дней получали стандартный полусинтетический рацион, крысы 1-й опытной группы – рацион с включением Кв (Sigma-Aldrich, США) в количестве, обеспечивающем дозу 100 мг/кг м.т., животные 2-й опытной группы - рацион с включением Рес (DSM, Нидерланды) в том же количестве, 3-й опытной группы – рацион, содержащий Кв и Рес в количестве, обеспечивающем дозу 100 мг/кг м.т. каждого.

Включение в рацион Кв и Рес как по отдельности, так и совместно не оказывало влияния на общее состояние животных, массу тела и относительную массу печени (Таблица 9).

Таблица 9 – Масса тела и относительная масса печени у крыс контрольной и опытных групп

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +кверцетин	2-я опытная, +ресвератрол	3-я опытная, +кверцетин +ресвератрол
Масса тела, г				
исходная	182±9	203±8	199±8	193±10
конечная	213±9	241±7	237±8	231±7
Относительная масса печени, %	3,56±0,23	3,54±0,19	3,30±0,12	3,38±0,15

При введении в рацион крыс Кв или Рес не было обнаружено отличий уровня активности ГО-1 от контрольного уровня. Однако, при совместном введении Кв и Рес обнаружено небольшое возрастание активности ГО-1 (на 18%) относительно контроля, достоверно отличавшееся от уровня активности фермента у крыс, получавших только Кв (на 22%) или только Рес (21%) (Таблица 10, Рисунок 15А).

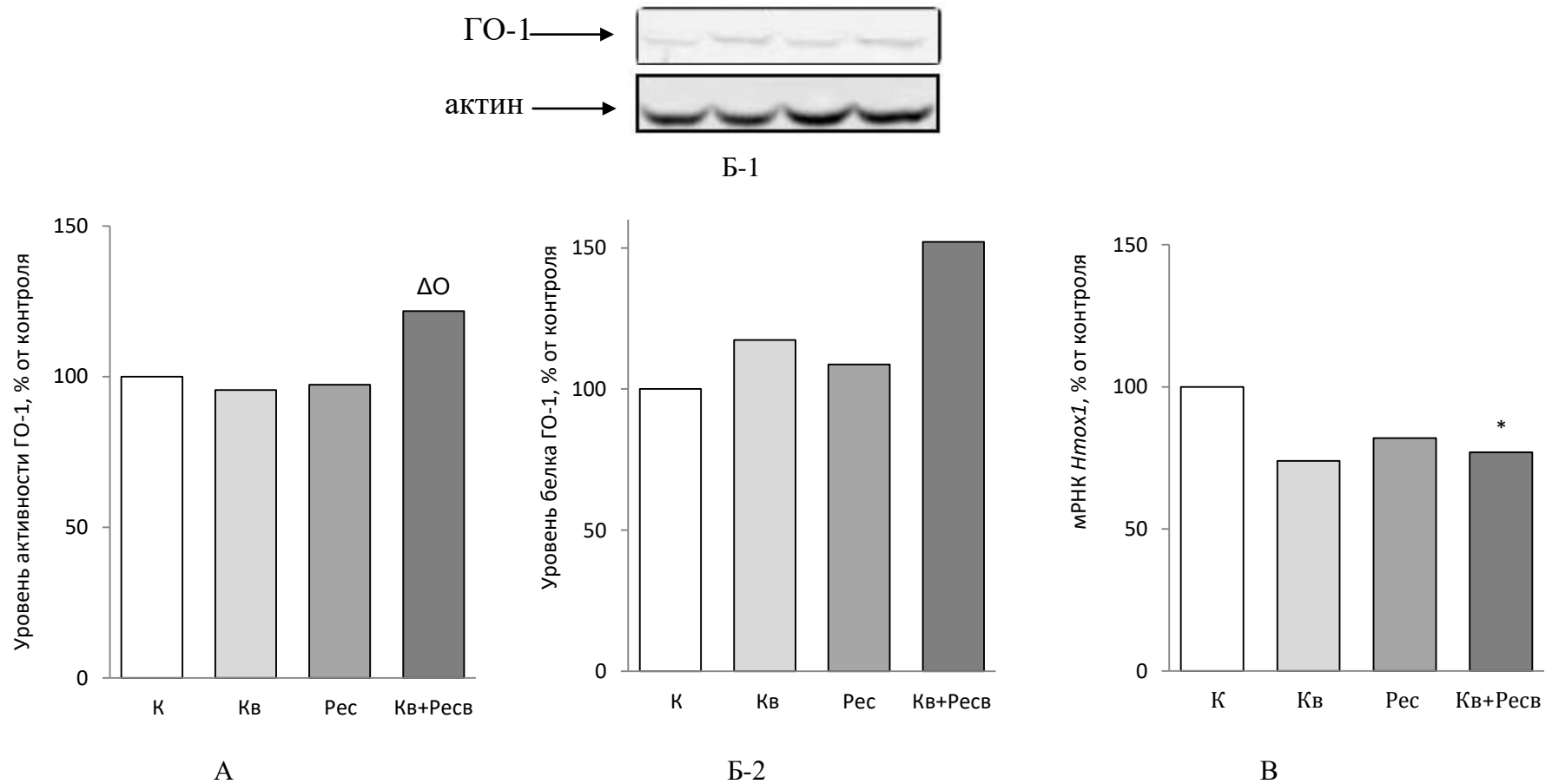
Согласно данным вестерн-блот анализа, введение в рацион Кв или Рес не оказывало существенного влияния на уровень экспрессии белка ГО-1. В свою очередь, включение в рацион Кв и Рес совместно приводило к недостоверному увеличению экспрессии белка ГО-1 на 52% относительно контроля (Таблица 10, Рисунок 15Б).

Как показано в Таблице 10 и Рисунке 15В содержание мРНК *Hmox1* в печени крыс несколько снижалось по сравнению с контролем при включении в рацион Кв - на 26% ($p>0,05$), Рес - на 18% ($p>0,05$) и Кв+Рес - на 23% ($p<0,05$).

Таблица 10 – Влияние кверцетина и ресвератрола на активность ГО-1, экспрессию белка ГО-1 и гена *Hmox1* при их отдельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +кверцетин	2-я опытная, +ресвератрол	3-я опытная, +кверцетин +ресвератрол
Активность ГО-1, мкмоль/мин•мг белка	10,48±0,60	10,02±0,42	10,20±0,48	12,76±1,36 ^{ΔО}
Уровень экспрессии белка ГО-1	7,67±1,12	9,0±1,57	8,33±0,61	11,67±2,36
Уровень экспрессии гена <i>Hmox1</i>	1,00	0,74	0,82	0,77*

Примечание – * - статистически значимое различие ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, О - со 2-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (Кв), О - со 2-й опытной группой (Рес)

Рисунок 15 – Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2) и уровень мРНК *Hmox1* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии кверцетина и ресвератрола

Обогащение рациона крыс как Кв, так и Рес не оказывало влияние на активность ХР относительно контрольного уровня, но их совместное включение в рацион усиливало, хотя и недостоверно, активность ХР на 38% относительно контроля (Таблица 11, Рисунок 16А).

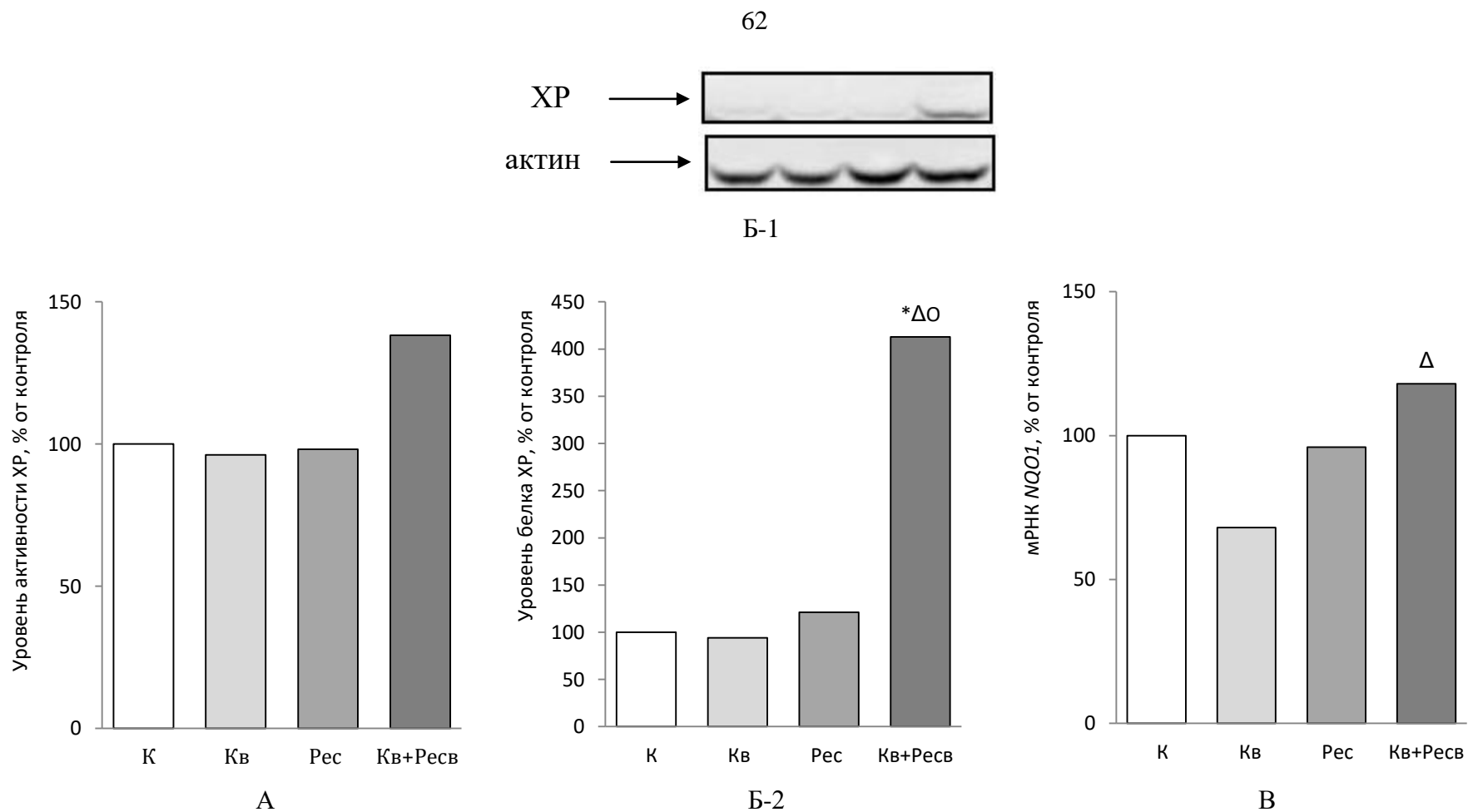
Уровень белка ХР в печени крыс при обогащении рациона Кв не изменялся значимо от контрольного уровня, а при добавлении Рес возрастал на 21% ($p>0,05$). Как видно из Таблицы 11 и Рисунка 16Б, при сочетанном поступлении Кв и Рес содержание белка ХР в печени крыс возрастало в 4 раза ($p<0,05$) относительно контроля и достоверно превышало содержание белка фермента в 1-й и во 2-й опытных группах в 4,3 и 3,4 раза, соответственно.

Уровень экспрессии гена *NQO1* несколько снижался при действии Кв (на 32%; $p>0,05$) и не отличался от контрольного уровня при включении в рацион Рес. При совместном включении в рацион Кв и Рес экспрессия гена *NQO1* в печени крыс не отличалась существенно от контроля, но достоверно превышала на 73% уровень экспрессии гена *NQO1* в печени крыс, получавших только Кв (Таблица 11, Рисунок 16В).

Таблица 11 – Влияние кверцетина и ресвератрола на активность ХР, экспрессию белка ХР и гена *NQO1* при их отдельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +кверцетин	2-я опытная, +ресвератрол	3-я опытная, +кверцетин +ресвератрол
Активность ХР, нмоль/мин*мг белка	44,78±4,99	43,08±3,29	43,95±10,02	61,90±7,23
Уровень экспрессии белка ХР	6,6±1,33	6,2±1,32	8,0±2,12	27,25±7,05* ^{ΔO}
Уровень экспрессии гена <i>NQO1</i>	1,00	0,68	0,96	1,18 ^Δ

Примечание – * - статистически значимое различие ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ- с 1-й опытной группой, O - со 2-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание: * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-ой опытной группой (Кур), О - со 2-ой опытной группой (Кв)

Рисунок 16 – Активность фермента XР (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка XР (Б-1) и относительное содержание белка XР (Б-2) и уровень мРНК NQO1 (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии кверцетина и ресвератрола

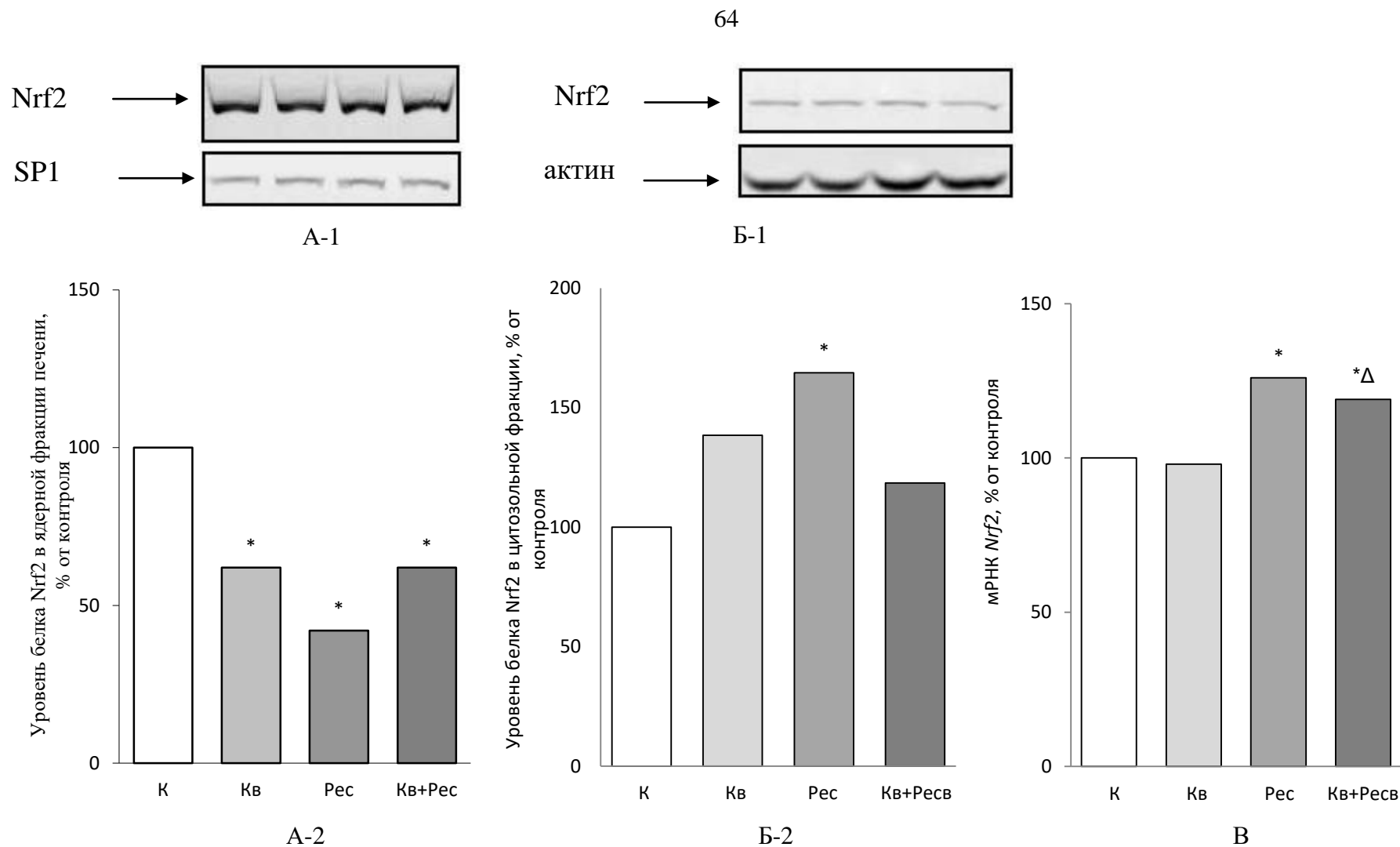
Включение в рацион Кв или Рес достоверно снижало экспрессию белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс в 1-й опытной группе - на 38%, во 2-й - на 52% и в 3-й - на 39% относительно контроля (Таблица 12, Рисунок 17А). В то же время, в цитозольной фракции печени Кв усиливал экспрессию белка Nrf2 на 38% ($p>0,05$), а Рес – на 64% ($p<0,05$) относительно контроля. При совместном действии Кв и Рес экспрессия белка Nrf2 практически не отличалась от уровня в контрольной группе (Таблица 12, Рисунок 17Б).

Данные ПЦР анализа показали, что Кв и Рес как по отдельности, так и совместно, не оказывали выраженного влияния на экспрессию гена *Nrf2*, хотя у крыс 2-й (Рес) и 3-й (Кв+Рес) опытных групп уровень мРНК *Nrf2* несущественно (на 26% и 20%, соответственно), но достоверно превышал контрольный уровень (Таблица 12, Рисунок 17В).

Таблица 12 – Влияние кверцетина и ресвератрола на экспрессию белка Nrf2 в ядерной и цитозольной фракциях и экспрессию гена *Nrf2* при их раздельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +кверцетин	2-я опытная, +ресвератрол	3-я опытная, +кверцетин +ресвератрол
Уровень экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс	1239,3±207,5	771,67±135,8*	596,67±98,6*	766,3±97,5*
Уровень экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции печени крыс	21,67±3,32	30,0±5,02	35,67±2,32*	25,67±2,91
Уровень экспрессии гена <i>Nrf2</i>	1,00	0,98	1,26*	1,19* ^Δ

Примечание – * - статистически значимое различие ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ- с 1-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белков и гена в относительных единицах, уровни экспрессии изучаемых белков нормализовали по уровню экспрессии белков сравнения: SP1 в ядерной фракции печени крыс и актин – в цитозольной, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-ой опытной группой (Кв)

Рисунок 17 – Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракциях печени и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракциях печени и уровень мРНК Nrf2 (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии кверцетина и ресвератрола

Таким образом, полученные результаты показали, что только совместное включение Кв и Рес в рацион здоровых интактных крыс приводило к достоверному повышению активности ГО-1 и экспрессии белка ГО-1 в печени животных, при отсутствии изменений экспрессии гена фермента. Аналогично, при отсутствии достоверных изменений в группах с добавлением в рацион Кв или Рес, только их совместное действие (3-я опытная группа) вызывало возрастание (недостоверное) активности ХР и резкое возрастание экспрессии белка ХР, а также небольшое, достоверное усиление экспрессии гена *NQO1*, относительно 1-й опытной группы. Установлено, что обогащение рациона крыс Кв и Рес как по отдельности, так и совместно снижает экспрессию белка Nrf2 в ядерной фракции, но усиливает его экспрессию в цитозольной фракции. При этом Рес как и Рес вместе с Кв индуцируют небольшое возрастание экспрессии гена *Nrf2*.

Литературные данные, полученные в основном в условиях *in vitro*, свидетельствуют о способности Кв оказывать индуцирующее влияние на ферменты антиоксидантной защиты. Так, в исследованиях [Ji L.L. et al., 2015] на клетках нормальной печени человека L02 Кв при индуцированном окислительном стрессе разной этиологии Кв индуцировал экспрессию гена *Hmox1*. При действии Кв на клетки злокачественной мезотелиомы наблюдали усиление экспрессии мРНК *Hmox1* и белка ГО-1 [Lee Y.J. et al., 2015]. В исследованиях [Valerio L.G. et al., 2001] воздействие Кв на клетки MCF-7 приводило к двукратному увеличению уровней белка NQO1 и активности фермента и увеличению экспрессии мРНК *NQO1* в три-четыре раза. Также воздействие Кв на HepG2 дозозависимо усиливало экспрессию белка ХР и гена *NQO1* [Tanigawa S. et al., 2007].

В исследованиях *in vitro* разными авторами было показано индуцирующее действие Рес на антиоксидантные ферменты. Рес активировал экспрессию белка ГО-1 в клетках PC12 [Chen C.Y. et al., 2005]. В человеческих эпителиальных клетках Рес стимулировал экспрессию белка ХР [Wang Z. et al., 2012]. В исследованиях на астроцитах Рес также стимулировал ядерную транслокацию Nrf2 и увеличивал активность ХР [Erlank H. et al., 2011]. Рес заметно улучшал

выживаемость и пролиферацию нейронных стволовых клеток, уменьшал апоптоз и образование МДА и увеличивал активность супероксиддисмутазы и содержание глутатиона. При этом значительно возрастали уровни экспрессии белка Nrf2, ГО-1 и ХР [Shen C. et al., 2016]. Также в исследованиях [Ungvari Z. et al., 2010] в культивируемых артериальных эндотелиальных клетках Рес усиливал экспрессию генов *Hmox1* и *NQO1* и транслокацию Nrf2 в ядро.

Способность Кв и Рес индуцировать активность антиоксидантных ферментов *in vivo* показана лишь в единичных исследованиях. Так, в исследованиях на крысах было показано, что обогащение рациона рутином – гликозидом Кв, приводит к дозозависимому возрастанию активности ГО-1 [Кравченко Л.В. и соавт., 2015] и ХР [Ускова М.А. и соавт., 2010]. В исследованиях других авторов введение крысам Кв также вызывало избирательное увеличение активности ГО-1 в печени [Tang Y. et al., 2013]. В исследованиях на крысах самках с опухолью молочных желез подкожное введение Рес приводило к индукции экспрессии гена *Nrf2* в тканях молочной железы и экспрессии Nrf2-регулируемых антиоксидантных генов *NQO1*, *SOD3* и *OGG1* [Singh B. et al., 2014]. По данным [Wang B. et al., 2013] обогащение высокожирового рациона Рес приводило к усилению экспрессии генов *AhR* и *NQO1* в печени мышей. Однако, при включении Рес в рацион здоровых интактных крыс не наблюдали изменений активности Nrf2- контролируемых ферментов [Трусов Н.В. и соавт., 2010].

Результаты наших исследований показали, что совместное включение в рацион Рес и Кв характеризуется значительным усилением их индуцирующего действия на активность фермента и экспрессию белка ГО-1 и ХР.

Таким образом, полученные результаты показали, что у интактных крыс Кв, также как Рес не оказывают значимого влияния на активность ГО-1 и ХР, на экспрессию белка ГО-1 и ХР и на экспрессию генов *Hmox1* и *NQO1*. В то же время при совместном действии Кв и Рес наблюдалась умеренная активация ГО-1 ($p < 0,05$) и ХР ($p > 0,05$) и экспрессии их белка, но не обнаруживалось влияние на экспрессию их генов. Следует отметить выраженную тенденцию снижения

экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции и умеренное возрастание экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции печени, как при отдельном, так и при совместном действии Кв и Рес.

3.3 Изучение влияния куркумина и кверцетина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм

Целью исследований данного раздела являлось изучение влияния Кур и Кв на активность, экспрессию белка и гена ГО-1 и ХР и на экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс при раздельном и сочетанном поступлении в организм. Результаты исследования представлены в [Аксенов И.В. и соавт., 2016; Балакина А.С. и соавт., 2017; Балакина А.С., 2017, 2022].

Исследования проводили на 4-х группах крыс-самцов линии Вистар (по 8 особей в каждой). Крысы контрольной группы в течение 14 дней получали стандартный полусинтетический рацион, крысы 1-й опытной группы – рацион с включением Кур (АО «ЭКО РЕСУРС», Россия) в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т., животные 2-й опытной группы - рацион с включением Кв (Sigma-Aldrich, США) в том же количестве, 3-й опытной группы – рацион, содержащий Кур и Кв в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т. каждого.

Включение в рацион Кур и Кв в течении 14 дней как по отдельности, так и совместно не оказывало влияния на общее состояние животных, массу тела и относительную массу печени (Таблица 13).

Таблица 13 – Масса тела и относительная масса печени у крыс контрольной и опытных групп

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, + куркумин	2-я опытная, + кверцетин	3-я опытная, +куркумин +кверцетин
Масса тела, г				
исходная	230±5	232±4	229±4	235±2
конечная	300±6	306±6	300±6	306±7
Относительная масса печени,%	3,02±0,06	3,17±0,11	3,04±0,05	3,05±0,09

Добавление в рацион крыс Кур (1-я опытная группа) или Кв (2-я опытная группа) не оказывало существенного влияния на активность ГО-1 в печени крыс. При совместном введении Кур и Кв в рацион активность ГО-1 в печени крыс возрастала на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и была достоверно выше активности ГО-1 в печени крыс 1-й опытной (на 36%) и 2-й опытной группах (на 21%) (Таблица 14, Рисунок 18А).

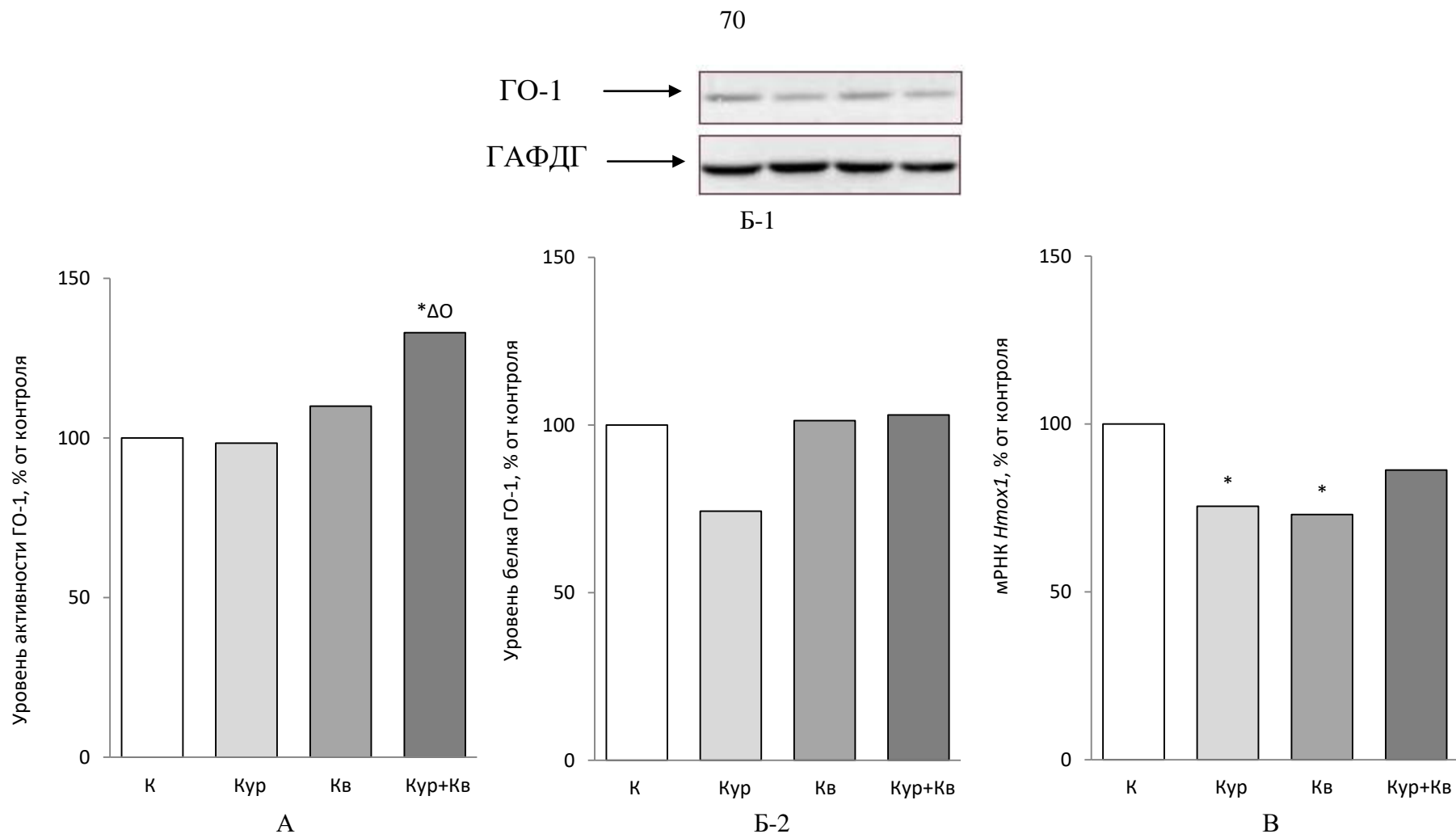
Результаты вестерн-блот анализа показали, что в печени крыс, получавших Кур, содержание белка ГО-1 снижалось на 26% ($p > 0,05$). При обогащении рациона Кв (2-я опытная группа) или Кур совместно с Кв (3-я опытная группа) количество белка ГО-1 в печени крыс не отличалось от контроля (Таблица 14, Рисунок 18Б).

Согласно данным ПЦР уровень мРНК *Hmox1* в печени крыс при введении Кур или Кв в рацион был несколько ниже контрольного уровня и практически не отличался от контроля в группе, получавшей Кур вместе с Кв (Таблица 14, Рисунок 18В).

Таблица 14 – Влияние куркумина и кверцетина на активность ГО-1, экспрессию белка ГО-1 и гена *Hmox1* при их отдельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, + куркумин	2-я опытная, + кверцетин	3-я опытная, + куркумин + кверцетин
Активность ГО-1, мкмоль/мин•мг белка	9,4±0,40	9,20±0,60	10,30±0,4	12,5±0,7* ^Δ ^О
Уровень экспрессии белка ГО-1	65,2±31,4	48,4±20,6	66,0±34,8	67,2±33,4
Уровень экспрессии гена <i>Hmox1</i>	1,00	0,75*	0,73*	0,86

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, О - со 2-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - ГАФДГ, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*



Примечание: * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-ой опытной группой (Кур), О - со 2-ой опытной группой (Кв)

Рисунок 18 – Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2) и уровень мРНК *Hmox1* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии куркумина и кверцетина

Как видно из Таблицы 15 и Рисунка 19А Кур не влиял на активность ХР в печени крыс. При включении Кв в рацион было отмечено некоторое повышение активности ХР на 32% ($p>0,05$) относительно контроля. При комбинированном действии Кур и Кв активность ХР не отличалась от контрольного уровня.

Результаты вестерн-блот анализа белка ХР в целом коррелируют с характером изменений активности ХР. Включение в рацион Кур не влияло существенно на экспрессию белка ХР, в то время как, у крыс 2-й опытной группы, получавших рацион с Кв, уровень белка ХР был выше контроля на 43% ($p>0,05$). При совместном поступлении Кур и Кв уровень экспрессии белка ХР в печени был ниже контрольного на 20% ($p>0,05$), и ниже, чем в печени животных, получавших только Кур (1-я опытная группа) или только Кв (2-я опытная группа) на 33% ($p>0,05$) и 44% ($p>0,05$), соответственно (Таблица 15, Рисунок 19Б).

По данным ПЦР Кур и Кв как по отдельности, так и совместно не оказывали значимого влияния на экспрессию гена *NQO1* (Таблица 15, Рисунок 19В).

Таблица 15 – Влияние куркумина и кверцетина на активность ХР, экспрессию белка ХР и гена *NQO1* при их раздельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, + куркумин	2-я опытная, + кверцетин	3-я опытная, +куркумин +кверцетин
Активность ХР, нмоль/мин•мг белка	298,7±47,1	305,0±30,7	408,2±53,7	281,5±53,6
Уровень экспрессии белка ХР	12,3±2,0	14,6±2,1	17,6±4,2	9,8±2,0
Уровень экспрессии гена <i>NQO1</i>	1,00	0,92	0,91	1,00

Примечание – в таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - ГАФДГ, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*.

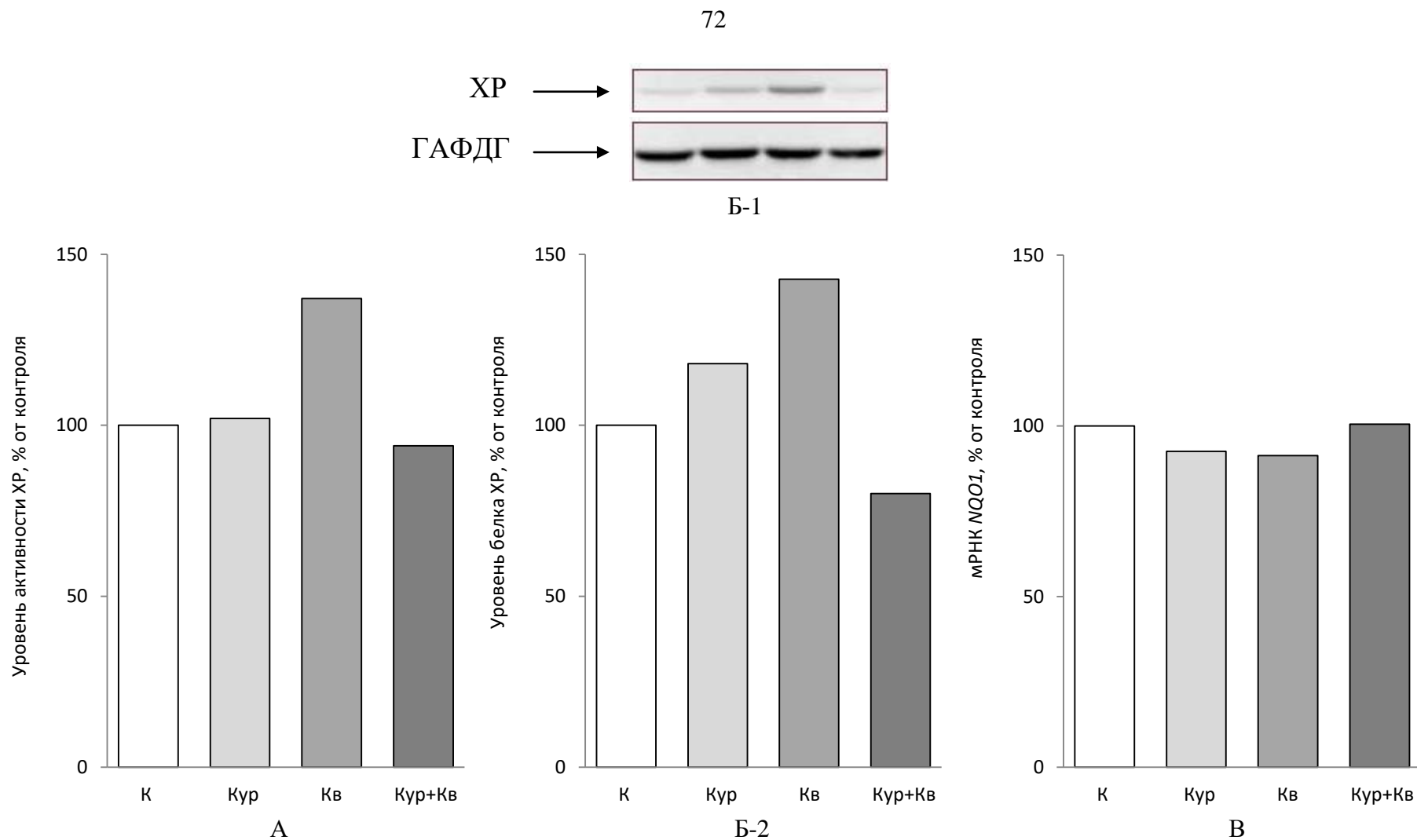


Рисунок 19 – Активность фермента ХР (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ХР (Б-1) и относительное содержание белка ХР (Б-2) и уровень мРНК *NQO1* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии куркумина и кверцетина

Не обнаружено существенного влияния Кур и Кв как при отдельном, так и при совместном действии на экспрессию белка Nrf2 в ядерной (Таблица 16, Рисунок 20А) и в цитозольной фракциях (Таблица 16, Рисунок 20Б). Включение Кур и Кв в рацион как отдельно, так и вместе не оказывало какого-либо влияния на содержание мРНК *Nrf2* в печени крыс (Таблица 16, Рисунок 20В).

Таблица 16 – Влияние куркумина и кверцетина на экспрессию белка Nrf2 в ядерной и цитозольной фракциях и экспрессию гена *Nrf2* при их отдельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, + куркумин	2-я опытная, + кверцетин	3-я опытная, + куркумин + кверцетин
Уровень экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс	353,5±59,1	412,8±64,0	349,2±52,7	365,3±34,1
Уровень экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции печени крыс	3,7±0,4	4,0±0,5	3,5±0,2	3,2±0,3
Уровень экспрессии гена <i>Nrf2</i>	1,00	0,93	0,89	1,09

Примечание – в таблице приведены данные экспрессии белков и гена в относительных единицах, уровни экспрессии изучаемых белков нормализовали по уровню экспрессии белков сравнения: SP1 в ядерной фракции печени крыс и ГАФДГ – в цитозольной, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*

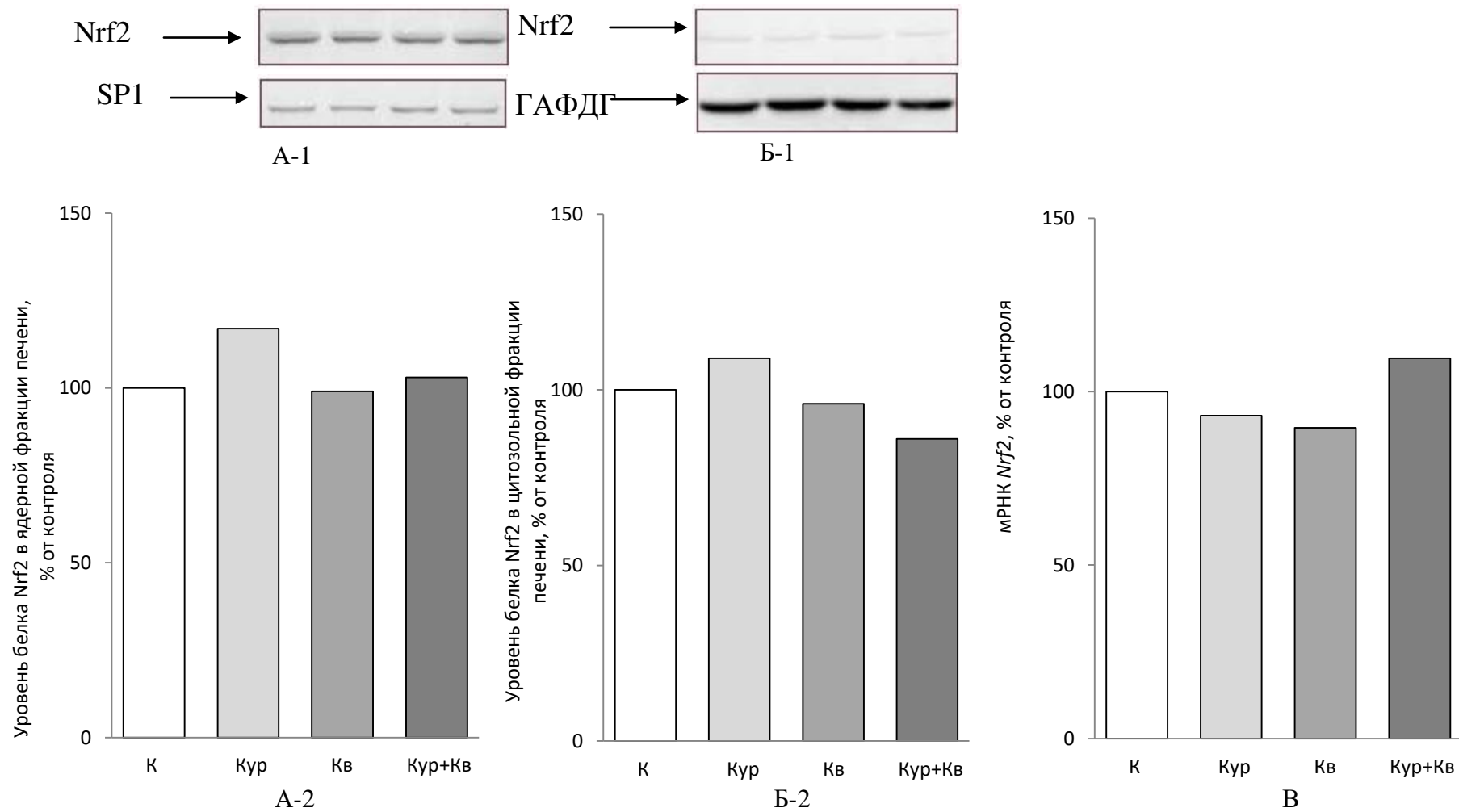


Рисунок 20 – Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракциях печен и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракциях печен и уровень мРНК *Nrf2* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии куркумина и кверцетина

Таким образом, полученные результаты показали, что включение в рацион Кур или Кв не оказывало влияния на активность ГО-1 и экспрессию ферментного белка, в то время как при их совместном действии отмечалась синергическая активация фермента, не связанная с изменениями экспрессии белка и гена фермента. Активность ХР и уровни экспрессии белка ХР умеренно возрастали (недостаточно) у крыс, получавших Кв, но не отличались от контроля в группе с Кур и Кв.

Эти результаты согласуются с данными других авторов. Так, введение здоровым интактным крысам Кв в дозе 100 мг/кг м.т. в течение 90 дней приводило к усилению активности и экспрессии белка ГО-1 [Tang Y. et al., 2013]. В тех же исследованиях авторы обрабатывали клетки гепатоцитов НерG2 Кв, что приводило к дозозависимому увеличению активности фермента и экспрессии белка ГО-1. В исследованиях на здоровых интактных крысах Вистар введение Кур в дозе 200 мг/кг м.т. в течение 4-х недель также приводило к увеличению активности и экспрессии белка ГО-1 в печени крыс [Farombi E.O. et al., 2008].

Включение в рацион Кв в дозе 200 мг/кг м.т. приводило к статистически незначимому увеличению активности ХР и экспрессии белка ХР. Способность кверцетина индуцировать активность, экспрессию белка ХР и мРНК *NQO1* также показана *in vitro* на культурах клеток [Tanigawa S. et al., 2007, Valerio L.G. et al., 2001]. В этих же экспериментах *in vitro* получены доказательства связи индуцированной Кв активации ХР с усилением экспрессии гена и белка Nrf2, однако в исследованиях *in vivo* эти данные не получили подтверждения.

Имеются работы, свидетельствующие об усилении антиоксидантных и противовоспалительных эффектов Кв и Кур при их совместном действии [Kunnumakara A.V. et al., 2017]. Так синергизм антиоксидантных эффектов Кур и Кв наблюдали у крыс в индуцированном каррагинаном воспалении [Liu Y. et al., 2015], у мышей при токсическом действии бенз(а)пирена [Heeba G.H. et al., 2014], а также *in vitro* на раковых клетках [Zang J.Y. et al., 2015]. Отмечают, что как антиоксидантное, так и противовоспалительное действие Кур и Кв связано с их

способностью активировать ГО-1. Некоторые авторы [Kaur G. et al., 2016, Kumar S. et al., 2013, Astha M. et al., 2012, Panda A.K. et al., 2017] полагают, что Кв может потенцировать эффективность Кур путем снижения метаболизма Кур и повышения его биодоступности как *in vivo*, так и *in vitro*.

Защитные эффекты полифенолов в значительной степени связывают с их способностью активировать систему Nrf2/ARE, играющую центральную роль в адаптивных ответах клетки на окислительный стресс и цитотоксические воздействия. Так, например, у крыс в условиях окислительного стресса Кур и Кв в дозе 50 мг/кг м.т. индуцировали активность фермента ГО-1 и экспрессию мРНК *Hmox1*, и их эффект усиливался при совместном введении [Heeba G.H. et al., 2014]. Данные полученные на крысах [Farombi E.O. et al., 2008] и мышах [Liu S.M. et al., 2015] свидетельствуют о том, что в условиях окислительного стресса совместное введение Кур и Кв приводит к индукции ядерной транслокации Nrf2 и активации сигнального пути Nrf2/ARE и, как следствие, увеличению ферментной активности и экспрессии белка ГО-1.

Результаты изучения молекулярных механизмов индуцирующего действия Кур и Кв на активность ГО-1, полученные в исследованиях *in vitro*, свидетельствуют о том, что оно опосредовано, главным образом, их активирующим влиянием на транскрипционный фактор Nrf2 [Ji L. L. et al., 2015]. В отличие от данных, полученных в исследованиях *in vitro*, наши исследования, проведенные на здоровых интактных крысах, не выявили существенного влияния Кур и Кв как по отдельности, так и совместно на экспрессию мРНК *Hmox1* и мРНК *Nrf2*.

Таким образом можно заключить, что у интактных крыс высокие, но безопасные дозы Кур и Кв не вызывают достоверных изменений активности ГО-1 и ХР, экспрессии белка и экспрессии генов ферментов. Совместное введение Кур и Кв приводит к избирательному возрастанию активности ГО-1, не влияя на экспрессию белка ГО-1 и экспрессию гена *Hmox1*. Как по отдельности, так и совместно Кв и Кур не влияют на экспрессию белка Nrf2 и гена *Nrf2*.

3.4 Изучение влияния индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и сочетанном поступлении в организм

Целью исследований данного раздела являлось изучение влияния И-3-К и ЭГКГ на активность, экспрессию белка и гена ГО-1 и ХР и на экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс при их отдельном и сочетанном поступлении в организм. Результаты исследования представлены в [Трусов Н.В. и соавт., 2016, 2017; Балакина А.С., 2022].

Исследования проводили на 4-х группах крыс-самцов линии Вистар (по 8 особей в каждой). Крысы контрольной группы в течение 14 дней получали стандартный полусинтетический рацион, крысы 1-й опытной группы – рацион с включением И-3-К (Sigma-Aldrich, США) в количестве, обеспечивающем дозу 50 мг/кг м.т., животные 2-й опытной группы - рацион с включением ЭГКГ (DSM, Нидерланды) в количестве, обеспечивающем дозу - 200 мг/кг м.т., 3-й опытной группы – рацион, содержащий И-3-К и ЭГКГ в количестве, обеспечивающем дозу 50 и 200 мг/кг м.т., соответственно.

Включение в рацион И-3-К и ЭГКГ как по отдельности, так и совместно не оказывало влияния на общее состояние животных, массу тела и относительную массу печени (Таблица 17).

Таблица 17 – Масса тела и относительная масса печени у крыс контрольной и опытных групп

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +индол-3-карбинол	2-я опытная, +эпигалло-катехингаллат	3-я опытная, +индол-3-карбинол +эпигалло-катехингаллат
Масса тела, г				
исходная	217±2	216±3	215±3	214±3
конечная	271±2	266±5	265±6	263±5
Относительная масса печени, %	3,21±0,16	3,46±0,13	3,11±0,12	3,16±0,11

Данные представленные в Таблице 18 и Рисунке 21А, свидетельствуют о том, что включение И-3-К (1-я опытная группа) и ЭГКГ (2-я опытная группа) в рацион вызывало небольшое возрастание активности ГО-1 - на 11% ($p>0,05$) и на 18% ($p<0,05$), соответственно, относительно контроля. В свою очередь, при сочетанном применении в составе рациона И-3-К и ЭГКГ активность ГО-1 возрастала на 29% ($p<0,05$) относительно контрольного уровня и превышала на 16% ($p<0,05$) активность у крыс 1-й опытной группы, получавших И-3-К и на 9% ($p>0,05$) активность у крыс 2-й опытной группы, получавших ЭГКГ.

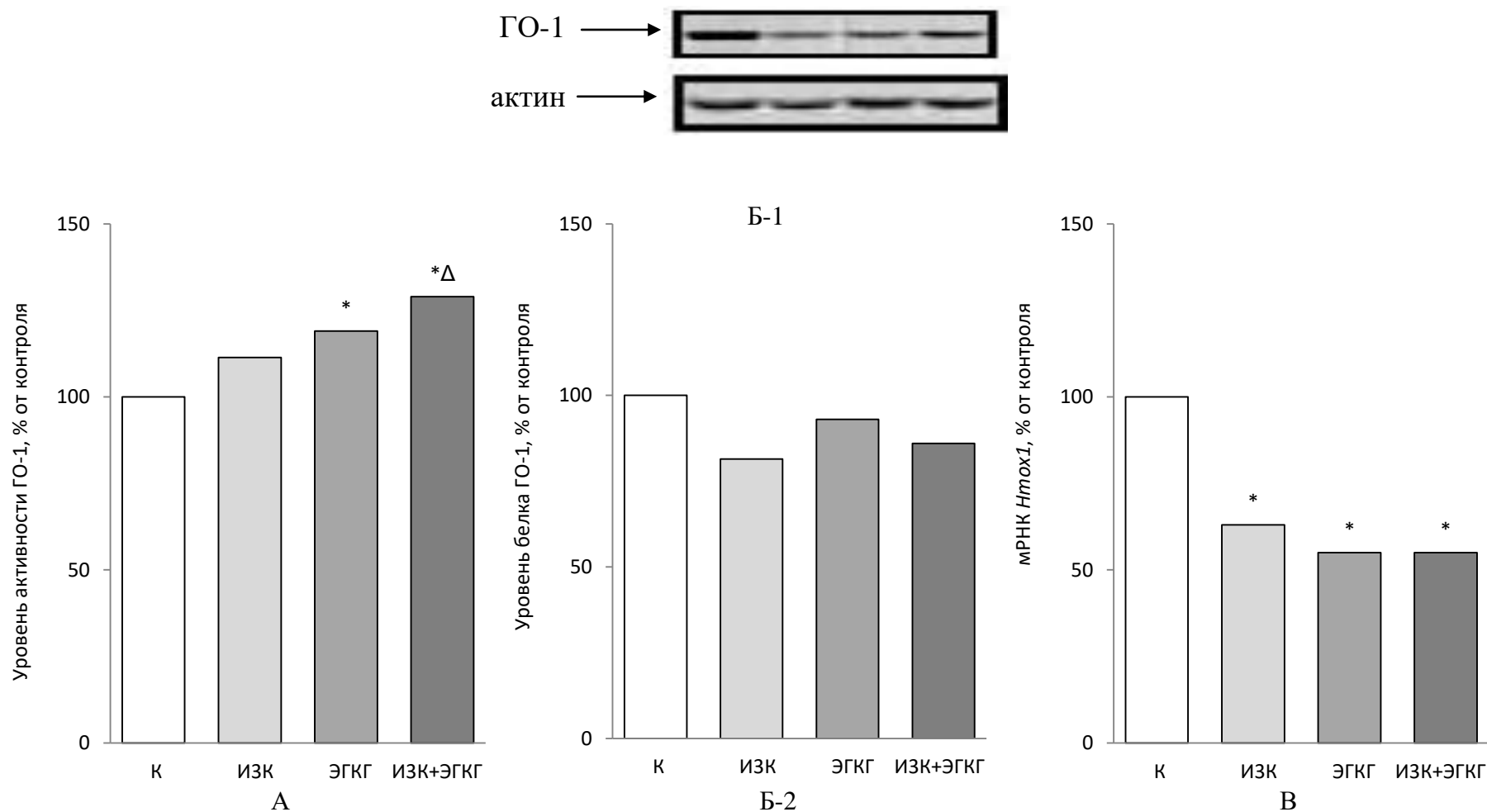
Результаты вестерн-блот анализа показали отсутствие статистически значимых различий в экспрессии белка ГО-1 в печени крыс между группами (Таблица 18, Рисунок 21Б).

По данным ПЦР уровень мРНК *Hmox1* в печени крыс достоверно снижался во всех опытных группах. Так, при включении И-3-К в рацион уровень экспрессии гена был ниже контрольного на 37%, ЭГКГ - на 45% , И-3-К совместно с ЭГКГ - на 45% (Таблица 18, Рисунок 21В).

Таблица 18 – Влияние индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на активность ГО-1, экспрессию белка ГО-1 и гена *Hmox1* при их отдельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +индол-3-карбинол	2-я опытная, +эпигаллокатехингаллат	3-я опытная, +индол-3-карбинол +эпигаллокатехингаллат
Активность ГО-1, мкмоль/мин•мг белка	8,4±0,3	9,3±0,5	9,9±0,7*	10,8±0,1* ^Δ
Уровень экспрессии белка ГО-1	150,8±16,2	123,0±24,0	140,3±22,4	129,7±9,2
Уровень экспрессии гена <i>Hmox1</i>	1,00	0,63*	0,55*	0,55*

Примечание – * - статистически значимое различие ($p<0,05$) по сравнению с контрольной группой, ^Δ - с 1-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (ИЗК)

Рисунок 21 – Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2) и уровень мРНК *Hmox1* (Б) в печени крыс при отдельном и совместном действии индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата.

Активность ХР в печени крыс 1-й опытной группы (И-3-К), хотя и недостоверно, превышала контрольный уровень на 79%; во 2-й (ЭГКГ) - на 24%; в 3-й (И-3-К+ЭГКГ) - на 47% (Таблица 19, Рисунок 22А).

Также не обнаруживали статистически достоверных изменений уровня белка ХР в печени крыс опытных групп, хотя у крыс, получавших ЭГКГ экспрессия белка ХР в печени крыс была снижена на 40%, но недостоверно по сравнению с контролем (Таблица 19, Рисунок 22Б).

Изменения уровня экспрессии гена *NQO1* имели однонаправленный характер с изменением активности ХР, но также были статистически незначимыми. Поступление И-3-К в организм животных приводило к усилению экспрессии мРНК *NQO1* в печени крыс на 56%; ЭГКГ – на 15%; а в печени животных 3-й опытной группы, получавших И-3-К вместе с ЭГКГ, - на 70%, что можно расценивать как аддитивность эффектов И-3-К и ЭГКГ на экспрессию гена *NQO1* (Таблица 19, Рисунок 22В).

Таблица 19 – Влияние индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на активность ХР, экспрессию белка ХР и гена *NQO1* при их раздельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +индол-3-карбинол	2-я опытная, +эпигалло-катехингаллат	3-я опытная, +индол-3-карбинол +эпигалло-катехингаллат
Активность ХР, нмоль/мин•мг белка	191,5±43,6	343,3±89,6	238,7±35,6	281,8±64,6
Уровень экспрессии белка ХР	95,7±48,8	98,5±35,9	57,0±15,7	73,0±21,4
Уровень экспрессии гена <i>NQO1</i>	1,00	1,56	1,15	1,70

Примечание: В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*

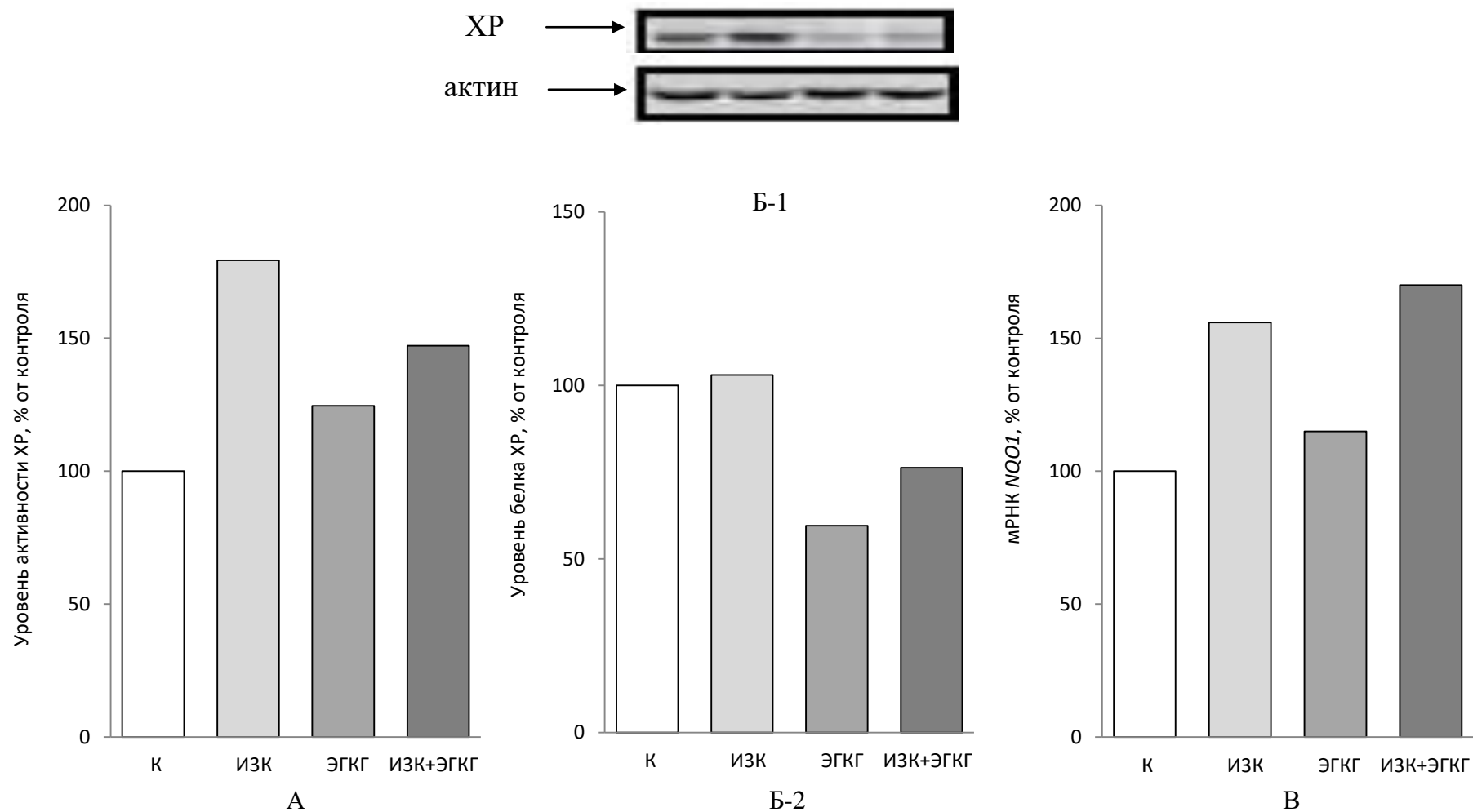


Рисунок 22 – Активность фермента ХР (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ХР (Б-1) и относительное содержание белка ХР (Б-2) и уровень мРНК *NQO1* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата

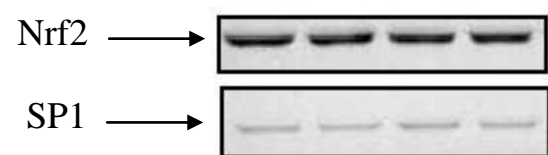
Как видно из данных, представленных в Таблице 20 и на Рисунке 23А и 23Б, не обнаружено существенных различий между группами в экспрессии белка транскрипционного фактора *Nrf2* как в ядерной, так и в цитозольной фракции печени крыс.

Влияние И-3-К и ЭГКГ на экспрессию гена *Nrf2* характеризовалось умеренным, на 20% и 33%, соответственно ($p > 0,05$), снижением уровня мРНК *Nrf2* в печени крыс. В тоже время при комбинированном действии И-3-К и ЭГКГ экспрессия гена *Nrf2* не отличалась от контроля и достоверно превышала уровень экспрессии у крыс 1-й опытной группы на 20% и 2-й – на 33% (Таблица 20, Рисунок 23В).

Таблица 20. Влияние индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на экспрессию белка *Nrf2* в ядерной и цитозольной фракциях и экспрессию гена *Nrf2* при их раздельном и совместном действии

Показатель	Группа животных, рацион			
	Контрольная	1-я опытная, +индол-3-карбинол	2-я опытная, +эпигаллокатехингаллат	3-я опытная, +индол-3-карбинол +эпигаллокатехингаллат
Уровень экспрессии белка <i>Nrf2</i> в ядерной фракции печени крыс	634,5±66,8	558,8±65,5	513,2±51,4	630,8±65,6
Уровень экспрессии белка <i>Nrf2</i> в цитозольной фракции печени крыс	20,3±2,8	23,0±2,8	22,7±4,2	22,3±2,2
Уровень экспрессии гена <i>Nrf2</i>	1,00	0,80*	0,67*	1,00 ^{ΔО}

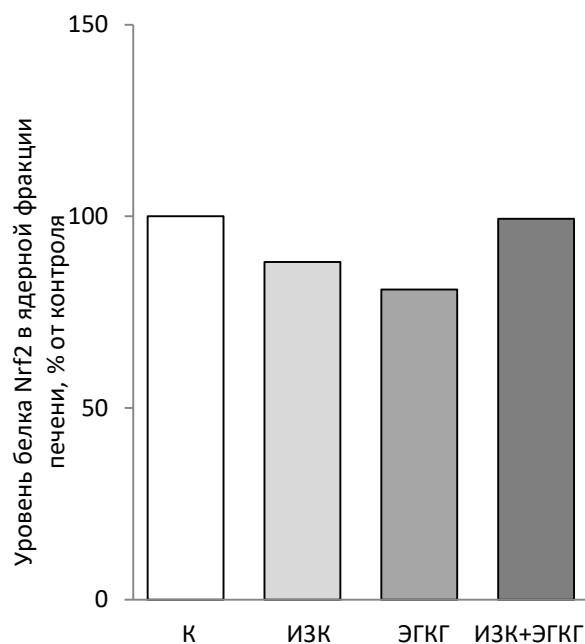
Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, О - со 2-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белков сравнения: SP1 в ядерной фракции печени крыс и актин – в цитозольной, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*



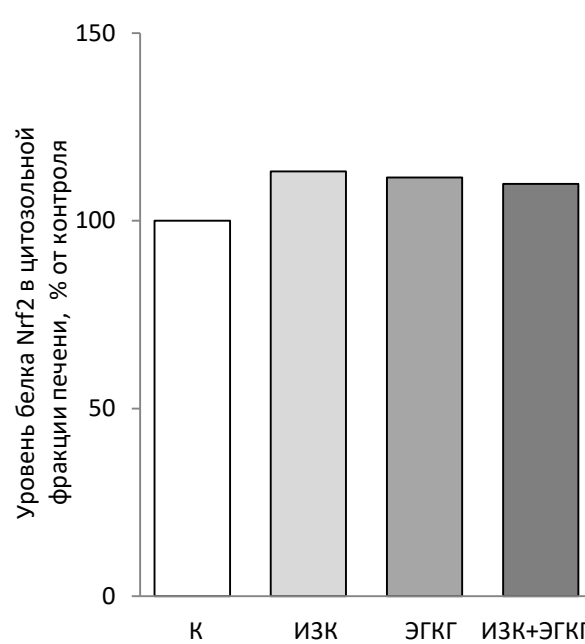
А-1



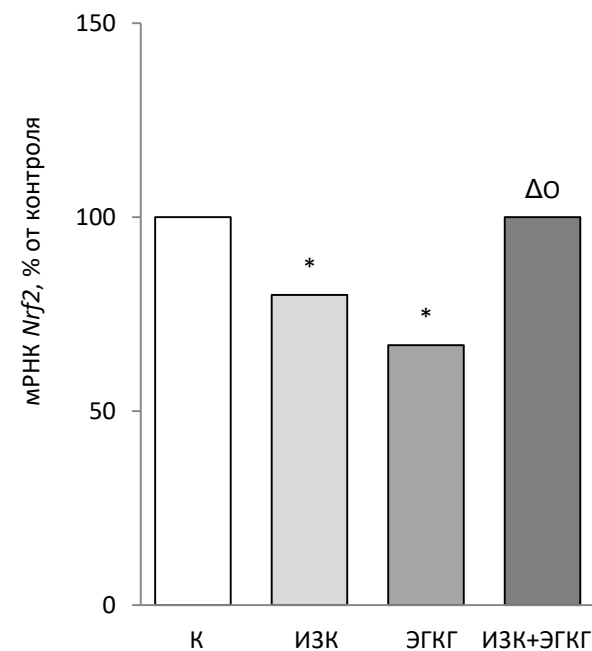
Б-1



А-2



Б-2



В

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (ИЗК), О - со 2-й опытной группой (ЭГКГ)

Рисунок 23 – Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракциях печени и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракциях печен и уровень мРНК Nrf2 (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата

Таким образом, полученные результаты показали, что включение в рацион крыс И-3-К и ЭГКГ по отдельности приводило к незначительному возрастанию активности ГО-1 в печени крыс. Важно отметить, что при совместном обогащении рациона И-3-К и ЭГКГ наблюдался аддитивный эффект на активность ГО-1. Однако не было выявлено корреляции изменения активности с изменением экспрессии белка ГО-1 и гена *Hmox1*. Возрастание активности ХР наиболее выражено отличалось от контроля при включении И-3-К как отдельно, так и совместно с ЭГКГ. Изменение активности ХР коррелировало с изменением экспрессии гена *NQO1* и также носило аддитивный характер в группе с включением И-3-К и ЭГКГ.

В исследованиях [Трусов Н.В. и соавт., 2010] И-3-К при включении в рацион крыс самцов Вистар в дозе 20 мг/кг м.т. вызывал возрастание почти в двое активности ХР и небольшое (на 18%) увеличение активности ГО-1 в печени крыс, что совпадает с полученными нами результатами. У мышей внутрижелудочное введение И-3-К в дозе 100 мг/кг м.т. приводило к возрастанию в печени активности и экспрессии белка ХР, а также к усилению транслокации *Nrf2* в ядро, что свидетельствует об участии фактора *Nrf2* в И-3-К зависимой индукции экспрессии гена *NQO1* [Krajka-Kuzniak V. et al., 2011]. В исследовании у здоровых интактных крыс включение ЭГКГ в рацион в дозе 105 мг/кг массы тела в течение 2 недель, также как и в наших исследованиях, не вызывало существенного изменения активности ГО-1 и экспрессии белка ГО-1 и *Nrf2* [Кравченко Л.В. И. и соавт., 2011]. Обогащение рациона крыс ЭГКГ в дозе 100 мг/кг м.т. не оказывало статистически значимого влияния на уровень белка *Nrf2* в ядерной фракции почки и на уровень белка ГО-1 [Sahin K. et al., 2010]. Однако, в тех же исследованиях введение ЭГКГ на фоне окислительного стресса, вызванного Цисплатин-индуцированной нефротоксичностью, приводило к достоверному возрастанию, сниженного Цисплатином уровня *Nrf2* в ядерной фракции почки и уровня белка ГО-1. В тоже время в экспериментах на мышях обнаружено, что ЭГКГ вызывал дозозависимое возрастание экспрессии белка *Nrf2* и гена *Nrf2* [Zhang Z.M. et al., 2009] и экспрессии белка ГО-1 и гена *Hmox1* [Pullikotil P. et al., 2012].

Результаты изучения молекулярных механизмов индуцирующего действия И-3-К и ЭГКГ на активность антиоксидантных ферментов, полученные в исследованиях *in vitro*, свидетельствуют о том, что оно связано с индукцией экспрессии белка и гена фермента и опосредовано, главным образом, активирующим влиянием изученных БАВ на транскрипционный фактор Nrf2. В исследованиях на эндотелиальных клетках аорты человека (НАЕС) ЭГКГ увеличивал экспрессию мРНК *Hmox1* и экспрессию белка ГО-1 [Pullikotil P. et al., 2012]. На бычьих артериальных клетках ВАЕСs ЭГКГ в диапазоне 25-100 мкМ вызывал дозозависимое возрастание экспрессии белка ГО-1 и усиление ядерной транслокации Nrf2 [Wu C.C. et al., 2006]. По данным [Wu T.Y. et al., 2012, 2013] в культуре клеток TRAMP C1 И-3-К и его метаболит ДИМ индуцировали экспрессию генов *NQO1* и *Nrf2*. В клетках линии HepG2-C8 И-3-К и ДИМ (дииндолилметан) также индуцировали экспрессию мРНК Nrf2 и генов *NQO1* и *Hmox1* [Saw C.L. et al., 2011].

Данные о комбинированном действии И-3-К и ЭГКГ на активность ГО-1 и ХР и других антиоксидантных ферментов, так же как и сведения о взаимном влиянии этих флавоноидов на их биодоступность и метаболизм в организме, фактически отсутствуют. Полученные нами результаты показали, что совместное действие И-3-К и ЭГКГ приводит к небольшому усилению индивидуальных эффектов И-3-К и ЭГКГ на активность ГО-1. В настоящее время, на основе И-3-К и ЭГКГ был создан препарат «Промисан» нашедший применение в онкологии. Уникальность промисана обусловлена его способностью блокировать молекулярные механизмы, приводящие к патологической пролиферации, опухолевому неоангиогенезу и повышению инвазивной активности трансформированных клеток. Кроме того, он способен усиливать действие химиотерапевтических препаратов и восстанавливать чувствительность резистентных опухолей к лекарственным средствам [Таратонов А.В. и соавт., 2013].

Таким образом можно заключить, что у интактных крыс высокие, но безопасные дозы И-3-К и ЭГКГ не вызывают значительных изменений

активности ГО-1 и ХР. Совместное введение И-3-К и ЭГКГ приводит к избирательному возрастанию активности ГО-1, не влияя на экспрессию белка ГО-1 и экспрессию гена *Hmox1*. И-3-К и ЭГКГ как при раздельном, так и при совместном включении в рацион здоровых интактных крыс не оказывали значительного влияния на экспрессию гена и белка транскрипционного фактора Nrf2.

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИНОРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПИЩИ – АНТИОКСИДАНТОВ, НА АКТИВНОСТЬ, ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА И ГЕНА NRF2-РЕГУЛИРУЕМЫХ ФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ИХ РАЗДЕЛЬНОМ И СОЧЕТАННОМ ПОСТУПЛЕНИИ В ОРГАНИЗМ НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТОГО УГЛЕРОДА

4.1 Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Индуцированное четыреххлористым углеродом (CCl₄) поражение печени является наиболее часто используемой моделью для скрининга *in vivo* гепатопротекторной и антиоксидантной активности [Кравченко Л.В. и соавт., 2009, Ускова М.А. и соавт., 2009]. Установлено, что токсическое действие CCl₄ связано в первую очередь с прооксидантным действием образующихся в процессе его метаболизма свободных радикалов – трихлорметильного CCl₃^{*} и высокореактивного трихлорметилпероксильного CCl₃OO^{*} [Nakahira K. et al., 2003; Wen T. et al., 2006; Hafez M.M. et al., 2014; Vladimir-Knežević S. et al., 2015; Xie S.Z. et al., 2021].

Целью исследований данного раздела являлось изучение влияния Р и Гес на активность, экспрессию белка и гена ГО-1 и ХР и на экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс при раздельном и сочетанном поступлении в организм в условиях острого токсического действия четыреххлористого углерода. Результаты исследования представлены в [Балакина А.С. и соавт., 2016; Балакина А.С., 2016].

Исследования проводили на 5 группах крыс-самцов линии Вистар по 8 животных в каждой. Крысы контрольной и 1-й опытной групп в течение 14 дней получали полусинтетический (базовый) рацион, крысы 2-й опытной – тот же рацион с включением Р (Sigma-Aldrich, США) в количестве 400 мг/кг м.т., животные 3-й опытной группы получали рацион с включением Гес (Sigma-Aldrich, США) в том же количестве, 4-й опытной группы – рацион, содержащий Р

и Гес в количестве 400 мг/кг м.т. каждого. Животным опытных групп за 24 ч до окончания эксперимента вводили внутривентриально однократно CCl_4 в дозе 0,5 мл/кг м.т. в виде 25%-ного раствора в оливковом масле, крысам контрольной группы вводили равное количество оливкового масла (2 мл/кг м.т.). Животные получали воду без ограничений и корм в режиме свободного доступа из расчета 15 г сухой смеси на крысу в сутки. Контроль за поедаемостью корма и состоянием животных проводили ежедневно, определение массы тела - через день.

Однократное введение животным CCl_4 , а также включение в рацион Р и Гес на фоне CCl_4 как отдельно, так и совместно не оказывало какого-либо влияния на общее состояние животных и массу тела. Однако, введение CCl_4 приводило к выраженному увеличению относительной массы печени крыс по сравнению с контрольной группой: на 23% ($p < 0,05$) - в 1-й группе; на 22% ($p < 0,05$) - во 2-й группе; на 25% ($p < 0,05$) - в 3-й группе; на 29% ($p < 0,05$) - в 4-й группе (Таблица 21).

Таблица 21 – Масса тела и относительная масса печени у крыс контрольной и опытных групп

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, + CCl_4	2-я опытная, +рутин + CCl_4	3-я опытная, +гесперидин + CCl_4	4-я опытная, +рутин +гесперидин + CCl_4
Масса тела, г					
исходная	217±6	218±4	218±4	221±3	221±3
конечная	281±7	271±5	269±5	278±5	277±5
Относительная масса печени, %	3,38±0,12	4,16±0,11*	4,13±0,13*	4,22±0,19*	4,37±0,11*

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой

Инъекция CCl_4 приводила к значительному увеличению активности ГО-1 в печени крыс - на 60% ($p < 0,05$) относительно контроля. Включение в рацион Р несколько усиливало индуцирующий эффект CCl_4 на активность ГО-1 во 2-й опытной группе (на 73% ($p < 0,05$) превышало контрольный уровень). Поступление Гес с рационом усиливало эффект CCl_4 на активность ГО-1 - на 21% ($p < 0,05$) относительно активности у крыс 1-й опытной группы, и почти на 100% – по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При включении Р и Гес совместно в рацион наблюдалось наиболее выраженное возрастание активности ГО-1, которое достоверно превышало на 102% уровень активности фермента у крыс контрольной группы и на 26% - относительно 1-й опытной группы (Таблица 22, рисунок 24А).

Результаты вестерн-блот анализа показали, что острое токсическое действие CCl_4 приводило к значимому (в 5,3 раза) увеличению содержания белка ГО-1 в печени крыс (Таблица 22, рисунок 24Б) по сравнению с контролем. Уровень экспрессии белка ГО-1 в других опытных группах, получавших рацион с Р и/или Гес не значительно отличался от уровня в 1-й опытной группе и достоверно превышал контроль, соответственно, в 5,1 (2-я опытная группа), 4,8 (3-я опытная группа), 4,7 (4-я опытная группа) раза.

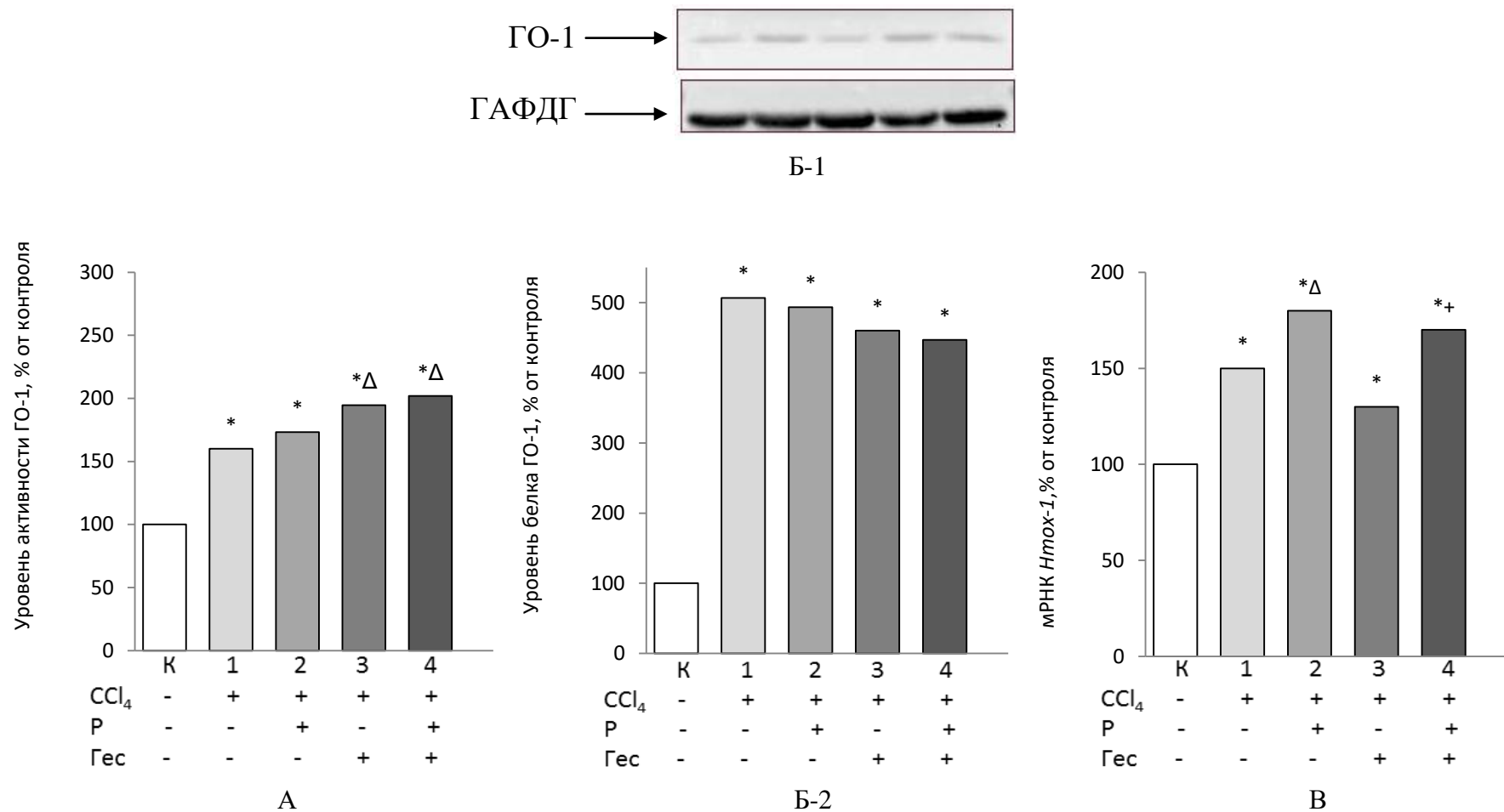
Результаты ПЦР анализа показали, что токсическое действие CCl_4 сопровождалось возрастанием, уровня экспрессии гена *Hmox1* в печени крыс в 1,5 ($p < 0,05$) раза относительно контроля. На фоне рациона с Р (2-я опытная группа) индуцирующее действие CCl_4 на уровень экспрессии *Hmox1* усиливалось. Так уровень экспрессии гена превышал контроль на 80% ($p < 0,05$) и уровень у крыс 1-й опытной группы - на 20% ($p < 0,05$). У крыс, получавших Гес (3-я опытная группа), уровень экспрессии гена *Hmox1* на 30% ($p < 0,05$) превышал контрольный, но был несколько ниже, чем у крыс 1-й опытной группы (CCl_4). При совместном действии Р и Гес обнаруживали достоверное усиление индуцирующего действия CCl_4 на уровень мРНК *Hmox1*, который в 4-й опытной группе превышал контрольный на 70% ($p < 0,05$), уровень экспрессии гена *Hmox1* в 1-й опытной

группе (CCl₄) – на 10% (p<0,05) и в 3-й опытной группе (Гес)– на 30% (p<0,05) (Таблица 22, Рисунок 24В).

Таблица 22 – Влияние рутина и гесперидина на активность ГО-1, экспрессию белка ГО-1 и гена *Hmox1* при их отдельном и совместном действии на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +рутин +CCl ₄	3-я опытная, +гесперидин +CCl ₄	4-я опытная, +рутин +гесперидин +CCl ₄
Активность ГО-1, мкмоль/мин•мг белка	9,6±0,3	15,4±1,2*	16,6±0,9*	18,7±1,2* ^Δ	19,4±1,5* ^Δ
Уровень экспрессии белка ГО-1	1,8±0,4	9,5±1,1*	9,2±0,5*	8,6±1,0*	8,4±0,9*
Уровень экспрессии гена <i>Hmox1</i>	1,0	1,5*	1,8* ^Δ	1,3*	1,7* ⁺

Примечание – * - статистически значимое различие (p<0,05) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, +- с 3-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - ГАФДГ, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (CCl₄), +- с 3-й опытной группой (CCl₄+Гес).

Рисунок 24 – Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2) и уровень мРНК *Hmox1* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии рутина и гесперидина на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Острое токсическое действие CCl_4 приводило к небольшому снижению активности ХР на 24% ($p > 0,05$) в печени крыс относительно контрольного уровня. Обогащение рациона как Р, так и Гес приводило к уменьшению подавляющего действия CCl_4 на активность ХР, уровень которой во 2-й и 3-й опытных группах практически не отличался от контрольного. При совместном включении в рацион Р и Гес (4-я опытная группа) уровень активности ХР, сниженный после введения CCl_4 , достоверно, на 50%, превышал уровень активности фермента у крыс 1-й опытной группы и был несколько выше (на 13%; $p > 0,05$) контрольного (Таблица 23, Рисунок 25А).

Уровень белка ХР, также как и уровень активности ХР, но значительно в большей степени, снижался - до 36% от контроля ($p < 0,05$) в печени крыс 1-й опытной группы. Включение в состав рациона Р и/или Гес приводило к восстановлению количества белка ХР, сниженного введением CCl_4 . Так, содержание белка ХР во 2-й опытной группе (Р) превышало количество белка ХР в 1-й опытной группе (CCl_4) на 65% ($p > 0,05$), в 3-й (Гес) – на 70% ($p > 0,05$) и в 4-й (Р+Гес) – на 111% ($p > 0,05$) (Таблица 23, Рисунок 25Б).

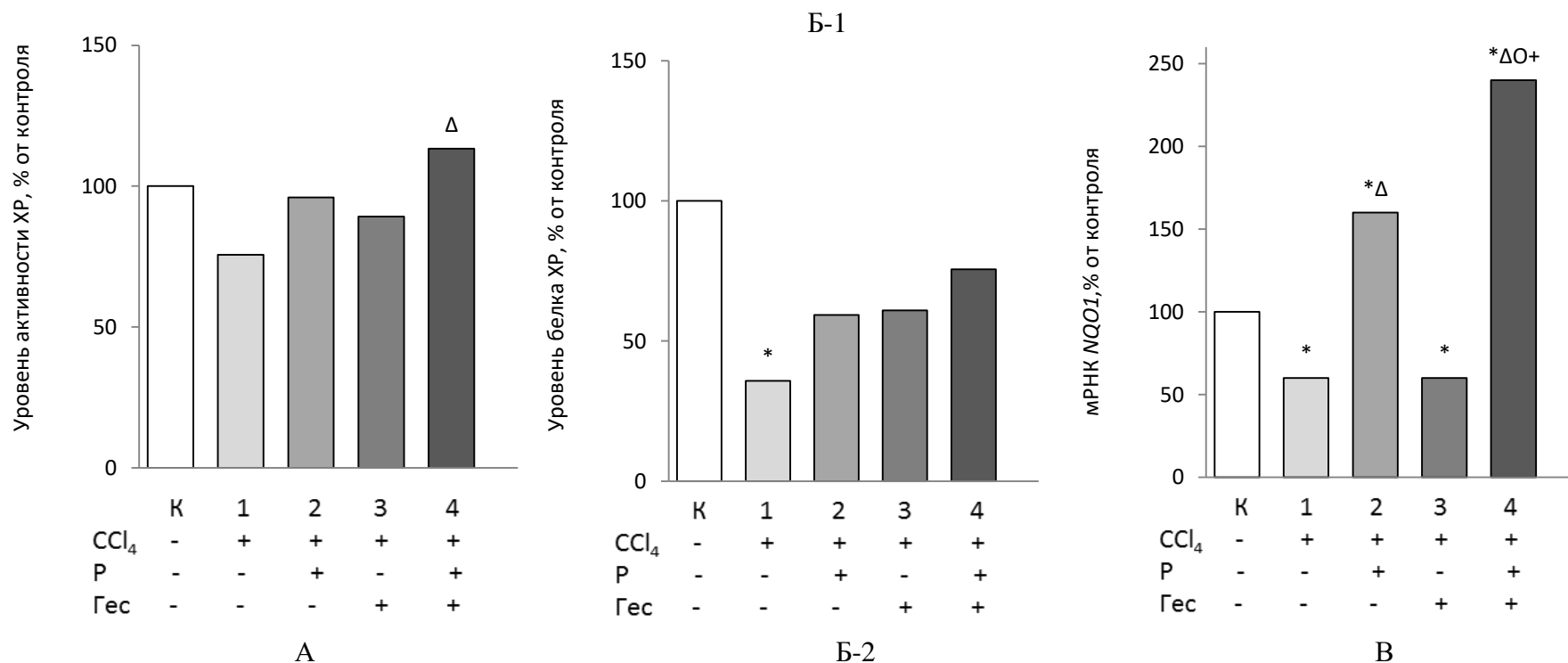
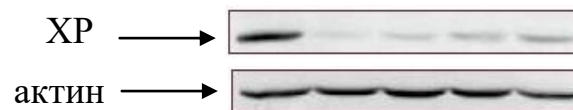
Однократное введение CCl_4 (1-я опытная группа) приводило к значительному подавлению уровня экспрессии мРНК *NQO1* (на 40%; $p < 0,05$), так же как и содержания белка ХР, относительно контроля. Уровень экспрессии мРНК *NQO1* в группе с Р (2-я опытная группа) не только восстанавливался до контрольного уровня, но и превышал его на 60% ($p < 0,05$), и отличался почти в 3 раза от уровня экспрессии гена фермента у крыс 1-й опытной группы. При включении в рацион Гес (3-я опытная группа) уровень мРНК *NQO1* в печени крыс не отличался от количества мРНК у животных 1-й опытной группы. Однако, при включении вместе с Р (4-я опытная группа) экспрессия гена *NQO1* возрастала до уровня, превышающего контрольный в 2,4 раза и в 4 раза превышающего уровень экспрессии гена у крыс, получавших только CCl_4 (1-я опытная группа) (Таблица 23, Рисунок 25В).

Таблица 23 – Влияние рутина и гесперидина на активность ХР, экспрессию белка ХР и гена *NQO1* при их отдельном и совместном действии на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +рутин +CCl ₄	3-я опытная, +гесперидин +CCl ₄	4-я опытная, +рутин +гесперидин +CCl ₄
Активность ХР, нмоль/мин•мг белка	225,6±31,0	170,8±16,7	216,5±21,1	201,3±22,1	255,7±28,7 ^Δ
Уровень экспрессии белка ХР	30,7±10,9	11,0±11,6 [*]	18,2±4,7	18,7±6,4	23,2±5,8
Уровень экспрессии гена <i>NQO1</i>	1,0	0,6 [*]	1,6 ^{*Δ}	0,6 [*]	2,4 ^{*ΔO+}

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, O - со 2-й опытной группой, +- с 3-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*

94



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой, ΔO - со 2-й опытной группой (CCl_4), + - с 3-й опытной группой (CCl_4 +Гес)

Рисунок 25 – Активность фермента XР (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка XР (Б-1) и относительное содержание белка XР (Б-2) и уровень мРНК *NQO1* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии рутина и гесперидина на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

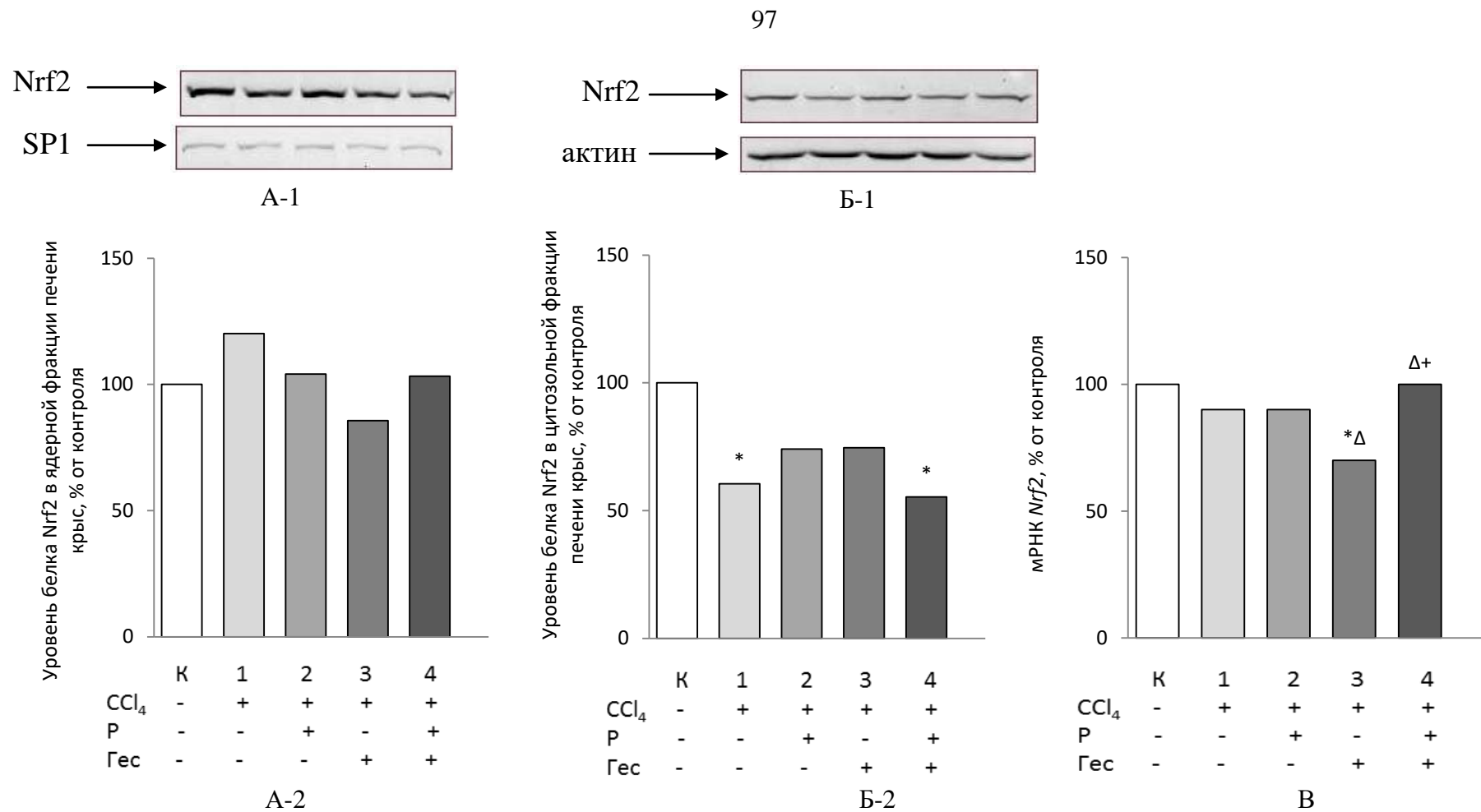
Изучение содержания белка Nrf2 показало, что введение CCl₄, вызывает незначительное (на 20%; $p > 0,05$) увеличение его уровня в ядерной фракции. Не обнаружено существенного влияния введения CCl₄ крысам на фоне обогащения рациона Р или Гес, как в отдельности, так и совместно на уровень экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции (Таблица 24, Рисунок 26А). В то же время, в цитозольной фракции обнаруживали снижение уровня белка Nrf2 на 40% ($p < 0,05$) после введения CCl₄ (1-я опытная группа). Обогащение рациона Р или Гес как отдельно, так и совместно не оказывало статистически значимого влияния на сниженный CCl₄ уровень экспрессии белка Nrf2 (Таблица 24, Рисунок 26Б).

Согласно результатам ПЦР анализа однократное введение CCl₄ (1-я опытная группа) не оказывало значимого влияния на уровень мРНК *Nrf2* в печени крыс. Введение CCl₄ на фоне рациона, содержащего Р (2-я опытная группа), также не сопровождалось изменением экспрессии гена *Nrf2*, в то время как на фоне рациона с Гес (3-я опытная группа) приводило к достоверному снижению экспрессии гена *Nrf2* относительно контроля на 30% ($p < 0,05$) и относительно уровня у крыс 1-й опытной группы на 22% ($p < 0,05$). При обогащении рациона и Р, и Гес (4-я опытная группа) уровень экспрессии гена *Nrf2* восстанавливался до контрольного и достоверно, на 20%, превышал уровень мРНК *Nrf2* в 1-й опытной группе (Таблица 24, Рисунок 26В).

Таблица 24 – Влияние рутина и гесперидина на экспрессию белка Nrf2 в ядерной и цитозольной фракциях и экспрессию гена *Nrf2* при их отдельном и совместном действии на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +рутин +CCl ₄	3-я опытная, +гесперидин +CCl ₄	4-я опытная, +рутин +гесперидин +CCl ₄
Уровень экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс	863±103	1037±209	898±221	739±116	891±163
Уровень экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции печени крыс	46,8±7,56	28,3±3,4*	34,6±6,6	34,9±4,8	25,9±3,1*
Уровень экспрессии гена <i>Nrf2</i>	1,0	0,9	0,9	0,7* ^Δ	1,0 ^{Δ+}

Примечание – * - статистически значимое различие (p<0,05) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, + - с 3-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белков сравнения: SP1 в ядерной фракции печени крыс и актин – в цитозольной, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ- с 1-й опытной группой (CCl₄), +- с 3-ей опытной группой (CCl₄+Гес)

Рисунок 26 – Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракциях печен и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракциях печен и уровень мРНК *Nrf2* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии рутина и гесперидина на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Таким образом, полученные результаты показали, что однократное внутрибрюшинное введение CCl_4 вызывает достоверное возрастание в печени крыс активности, экспрессии белка ГО-1 и экспрессии гена *Hmox1*, а также достоверное снижение более чем в 2 раза экспрессии белка ХР и экспрессии гена *NQO1*.

Эти результаты хорошо согласуются с данными [Кравченко Л.В. и соавт., 2009, Ускова М.А. и соавт., 2009], которые показали, что индуцированный CCl_4 окислительный стресс вызывает достоверное возрастание в печени крыс активности и экспрессии белка ГО-1, но снижает активность ХР. Возрастание экспрессии мРНК *Hmox1* и усиление транслокации Nrf2 в ядро наблюдали на ранних сроках после введения CCl_4 у мышей CD-1 [Randle L.E. et al., 2008]. Исследования [Nakahira K. et al., 2003] также показали индукцию экспрессии гена *Hmox1* и белка ГО-1 у крыс при токсическом действии CCl_4 . Полагают, что возрастание экспрессии ГО-1 может быть связано с быстрым увеличением концентрации свободного гема в результате повреждающего действия метаболитов CCl_4 на цитохромы P450 [Nakahira K. et al., 2003]. В исследовании [Wu T. et al., 2017] у взрослых самцов крыс Sprague-Dawley вызывали гепатотоксичность введением CCl_4 в течение восьми недель (0,3 мл/100 г, подкожно два раза в неделю) и обнаруживали выраженное снижение уровня экспрессии белка ХР в печени крыс, получавших CCl_4 , по сравнению с контролем. Так же у 5-недельных самцов крыс Sprague-Dawley инъекция 50% CCl_4 масляного раствора (1 мл/кг, внутрибрюшинно) вызывала снижение практически в 2 раза уровня мРНК *NQO1* в тканях печени по сравнению с контрольной группой [Han C.Y. et al., 2019].

Обогащение рациона крыс Р приводило к возрастанию активности ГО-1 и экспрессии мРНК *Hmox1*, относительно уровня индуцированного CCl_4 . В группе с Р уровень активности ХР, сниженный токсическим действием CCl_4 , восстанавливался до контрольного, а уровень экспрессия мРНК *NQO1* не только восстанавливался до контрольного, но и достоверно превышал его.

В ряде исследований показано гепатопротекторное действие Р на модели индуцированного CCl_4 окислительного стресса, которое связывают со способностью Р активировать антиоксидантные ферменты, в том числе ГО-1 [Khan R.A. et al., 2012, 2013; Domitrovic R. et al., 2012]. Так, в исследованиях на мышцах защитное действие Р и кверцетина коррелировало с индуцирующим действием Р на экспрессию мРНК *Nrf2* и *Hmox1* при вызванном CCl_4 повреждении печени [Domitrovic R. et al., 2012].

По сравнению с введением CCl_4 на фоне базового рациона (контрольная группа), при обогащении рациона Гес (3-я опытная группа) наблюдали достоверное усиление активирующего действия CCl_4 на ГО-1 при отсутствии изменений экспрессии ферментного белка и гена *Hmox1*. Относительно 1-й группы не было обнаружено статистически значимого влияния Гес на сниженную введением CCl_4 активность ХР, экспрессию белка и гена фермента. Имеются единичные работы, в которых сообщается о гепатопротекторном и нейропротекторном эффекте Гес при остром токсическом действии CCl_4 [Turkey N. et al., 2005] и относительно мало данных о его взаимодействии с Nrf2-сигнальным путем.

При совместном включении в рацион крыс Р и Гес (4-я опытная группа) наблюдалось выраженное возрастание активности ГО-1, достоверно превышавшее индуцированный CCl_4 уровень активности фермента, которое коррелировало с возрастанием экспрессии мРНК *Hmox1*. Обогащение рациона крыс одновременно Р и Гес не только восстанавливало до контрольного сниженный CCl_4 уровень активности фермента, но и индуцировало экспрессию гена *NQO1* до уровня, превышающего контрольный. При совместном включении Р и Гес в рацион отмечался синергизм в действии на экспрессию гена *NQO1*.

Интересно отметить, что у крыс в условиях CCl_4 -индуцированного окислительного стресса обнаружена тенденция к возрастанию уровня экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс, тогда как в цитозольной фракции наблюдали достоверное снижение уровня экспрессии белка. Как показали результаты ПЦР анализа, однократное внутрибрюшинное введение CCl_4 не

оказывало влияния на уровень мРНК *Nrf2*. Аналогичная тенденция наблюдалась и в изменении экспрессии белка *Nrf2* во 2-й, 3-й и 4-й опытных группах.

Результаты настоящей работы показали отсутствие изменений экспрессии гена *Nrf2* у крыс всех опытных групп, несмотря на значительные изменения экспрессии *Nrf2*-контролируемых генов *Hmox1* и *NQO1*. Это может объясняться тем, что регуляция активности фактора *Nrf2* происходит не на транскрипционном уровне, а, как полагают, на уровне стабилизации белка *Nrf2* [Dinkova-Kostova A.T. et al., 2017]. Стоит отметить, что, как показано в исследованиях *in vitro*, наряду со стабилизирующим механизмом возможен и другой путь активации *Nrf2* за счет дополнительного *de novo* синтеза *Nrf2*, не связанного со стабилизацией и транслокацией.

В исследованиях на крысиных кардиомиоцитах [Purdom-Dickinson S.E., Lin Y., et al., 2007; Purdom-Dickinson S.E., Sheveleva E.V., et al., 2007] и клетках HeLa [Covas G. et al., 2013] в условиях H_2O_2 - индуцированного окислительного стресса обнаружили, что низкие концентрации H_2O_2 , характерные для условий *in vivo*, вызывают дополнительный синтез *Nrf2 de novo*, не влияя на стабильность белка и его транслокацию в ядро. В связи с этими данными обращают на себя внимание результаты раздела 3.1 «Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белка и гена *Nrf2*-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм», которые показали общую тенденцию – увеличение белка *Nrf2* в цитозольной фракции при отсутствии изменения его уровня в ядерной, во всех группах крыс, получавших рационы с включением флавоноидов. В то же время, согласно данным [Purdom-Dickinson S.E., Sheveleva E.V., et al., 2007, Covas G. et al., 2013] окислительный стресс, индуцируемый высокими токсичными дозами H_2O_2 приводит к возрастанию уровня *Nrf2* в ядре (транслокации) при отсутствии изменений его уровня в цитозольной фракции.

В заключении следует подчеркнуть, что в условиях прооксидантного действия CCl_4 Р и Р+Гес усиливали адаптационный потенциал крыс, индуцируя экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты *Hmox1* и *NQO1*. Впервые

на модели окислительного стресса у крыс получены данные, демонстрирующие синергизм действия на уровне экспрессии гена фермента *NQO1* двух флавоноидов – Р и Гес, широко представленных в ежедневном рационе человека.

4.2 Изучение влияния куркумина и кверцетина на активность, экспрессию белка и гена Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Целью исследования данного раздела являлось изучение влияния Кур и Кв на активность, экспрессию белка и гена ГО-1 и ХР и на экспрессию белка и гена транскрипционного фактора Nrf2 в печени крыс при раздельном и сочетанном поступлении в организм в условиях острого токсического действия четыреххлористого углерода (1,0 мл/кг м.т.). Результаты исследования представлены в [Балакина А.С., 2016].

Исследования проводили на 5 группах крыс-самцов линии Вистар по 8 животных в каждой. Крысы контрольной и 1-й опытной группы в течение 14 дней получали полусинтетический (базовый) рацион, крысы 2-й опытной группы – базовый рацион с включением Кур (АО «ЭКО РЕСУРС», Россия) в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т., животные 3-й опытной группы - рацион с включением Кв (Sigma-Aldrich, США) в том же количестве, 4-й опытной группы – рацион, содержащий Кур и Кв в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т. каждого. Животным опытных групп за 24 ч до окончания эксперимента вводили внутривентриально однократно CCl_4 в дозе 1,0 мл/кг м.т. в виде 50%-ного раствора в оливковом масле, крысам контрольной группы вводили равное количество оливкового масла (2 мл/кг м.т.). Животные получали воду без ограничений и корм в режиме свободного доступа из расчета 15 г сухой смеси на крысу в сутки. Контроль за поедаемостью корма и состоянием животных проводили ежедневно, определение массы тела - через день.

Введение CCl_4 не оказывало влияния на общее состояние и массу тела подопытных крыс (Таблица 25), однако приводило к повышению относительной массы печени (на 36% в 1-й опытной группе относительно контроля), которое существенно не различалось между группами при раздельном и сочетанном поступлении Кур и Кв.

Таблица 25 – Масса тела и относительная масса печени у крыс контрольной и опытных групп

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +куркумин +CCl ₄	3-я опытная, +кверцетин +CCl ₄	4-я опытная, +куркумин +кверцетин +CCl ₄
Масса тела, г:					
исходная	178±8	180±6	178±3	178±3	176±4
конечная	243±10	225±6	224±5	229±7	229±3
Относительная масса печени, %	3,06±0,10	4,16±0,14*	4,49±0,21*	3,94±0,17*	4,51±0,13*

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой

Введение CCl₄ достоверно усиливало в печени крыс 1-й опытной группы активность ГО-1 в 2 раза по сравнению с контролем (Таблица 26, Рисунок 27А). Обогащение рациона Кур (2-я опытная группа) приводило к небольшому, хотя и достоверному, снижению на 19% индуцирующего действия CCl₄ на уровень активности ГО-1. Уровень активности ГО-1 у животных 3-й опытной группы, получавших CCl₄ на фоне рациона с Кв, не отличался от контрольного (1-я опытная группа). Активность ГО-1 в группе с включением как Кур, так и Кв (4-я опытная группа) достоверно снижалась – на 26% относительно уровня у крыс 1-й опытной группы (CCl₄), а также на 10% ($p > 0,05$) - у крыс получавших только Кур (2-я опытная группа) и на 24% ($p < 0,05$) – только Кв (3-я опытная группа).

Результаты вестерн-блот анализа показали существенное в 4,3 раза ($p < 0,05$) увеличение по сравнению с контролем содержания белка ГО-1 в печени крыс, получивших CCl₄ (1-я опытная группа). Введение CCl₄ на фоне включения в рацион Кур (2-я опытная группа) или Кв (3-я опытная группа) приводило к незначительному снижению на 19% и 13%, соответственно, количество белка ГО-

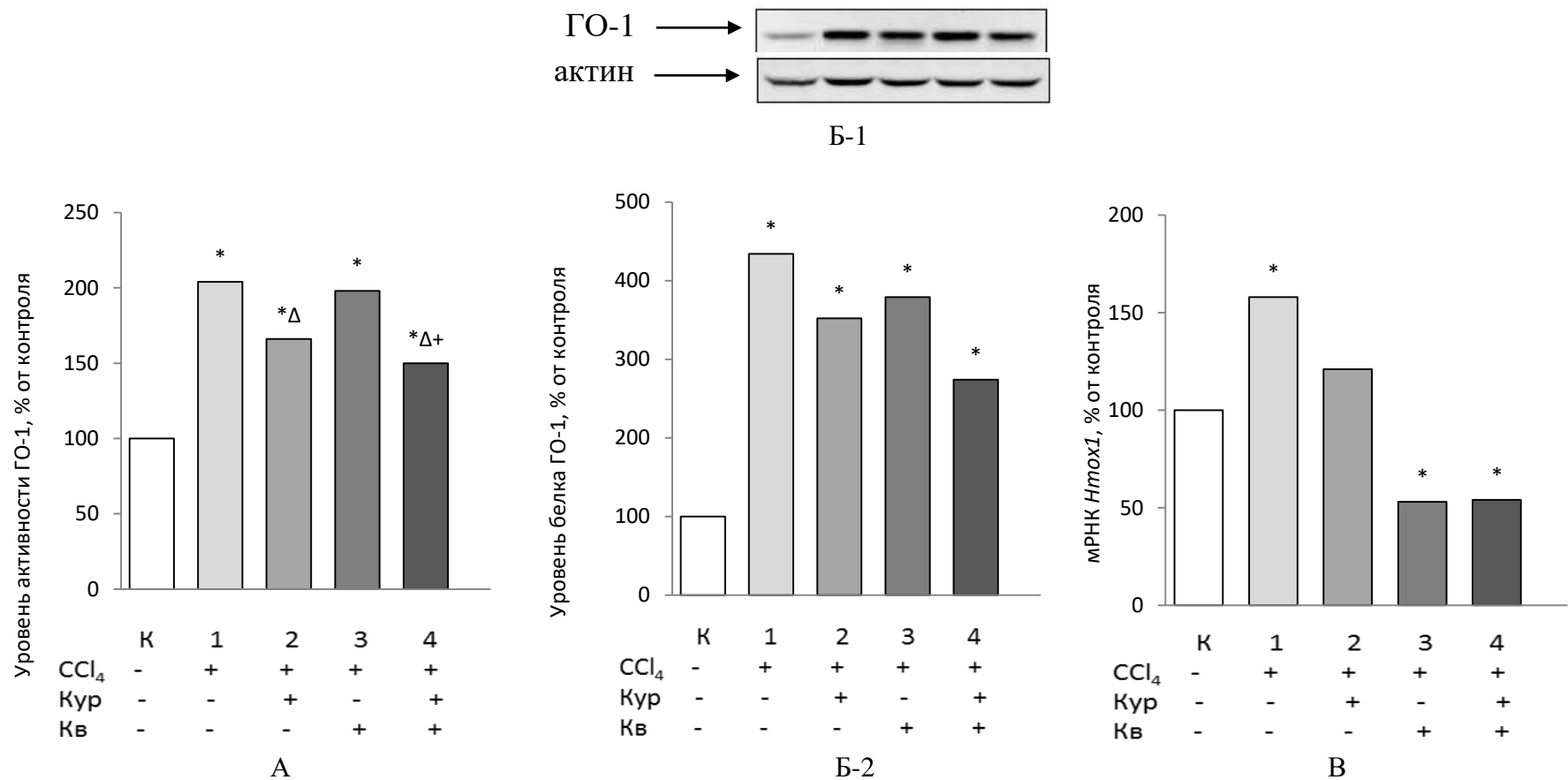
1, относительно уровня у крыс, которым CCl_4 вводили на фоне контрольного рациона (1-я опытная группа). При сочетанном добавлении в рацион крыс Кур и Кв (4-я опытная группа) снижение индуцирующего действия CCl_4 на количество белка ГО-1 в печени крыс было наиболее выраженным - на 37% ($p>0,05$) относительно 1-й опытной группы (CCl_4). При раздельном включении в рацион Кур (2-я опытная группа) или Кв (3-я опытная группа) уровень экспрессии белка ГО-1 на 22% ($p>0,05$) и на 28% ($p>0,05$), соответственно, превышал уровень экспрессии белка фермента у крыс 4-й опытной группы, получавших рацион с обоими веществами (Таблица 26, Рисунок 27Б).

Также, как и уровень активности и экспрессии белка ГО-1, экспрессия гена *Hmox1* в печени крыс возрастала на 57% ($p<0,05$) относительно контроля после однократного введения CCl_4 (1-я опытная группа). По сравнению с 1-й опытной группой обогащение рациона Кур (2-я опытная группа) приводило к снижению на 24% ($p>0,05$) индукции экспрессии гена *Hmox1*, вызванной CCl_4 . Включение в рацион Кв как отдельно (3-я опытная группа), так и совместно с Кур (4-я опытная группа), снижало уровень экспрессии мРНК *Hmox1* на 67% и 66% ($p<0,05$) соответственно, относительно уровня у крыс 1-й опытной группы (CCl_4) (Таблица 26, Рисунок 27В).

Таблица 26 – Влияние куркумина и кверцетина на активность ГО-1, экспрессию белка ГО-1 и гена *Hтох1* при их отдельном и совместном действии на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +куркумин +CCl ₄	3-я опытная, +кверцетин +CCl ₄	4-я опытная, +куркумин +кверцетин +CCl ₄
Активность ГО-1, мкмоль/мин•мг белка	4,6±0,2	9,5±0,4*	7,7±0,3* ^Δ	9,2±0,5*	7,0±0,2* ^{Δ+}
Уровень экспрессии белка ГО-1	389±62	1691±307*	1373±354*	1475±147*	1066±316*
Уровень экспрессии гена <i>Hтох1</i>	1,00	1,57*	1,20	0,53*	0,54*

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, + - с 3-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (CCl₄), + - с 3-й опытной группой (CCl₄+Гес)

Рисунок 27 – Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2) и уровень мРНК *Hmox1* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии куркумина и кверцетина на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Данные представленные в Таблице 27 и Рисунке 28А, свидетельствуют о том, что введение CCl_4 (1-я опытная группа) вызывало незначительное снижение уровня активности ХР в печени крыс (на 11%; $p>0,05$) относительно контроля. Включение в рацион Кур (2-я опытная группа) не оказывало существенного влияния на активность ХР относительно 1-ой опытной группы. Введение CCl_4 на фоне рациона с Кв (3-я опытная группа) приводило к увеличению на 24% ($p>0,05$) уровня активности ХР относительно уровня у крыс 1-й опытной группы. Совместное обогащение рациона Кур и Кв (4-я опытная группа) не влияло существенно на уровень активности ХР.

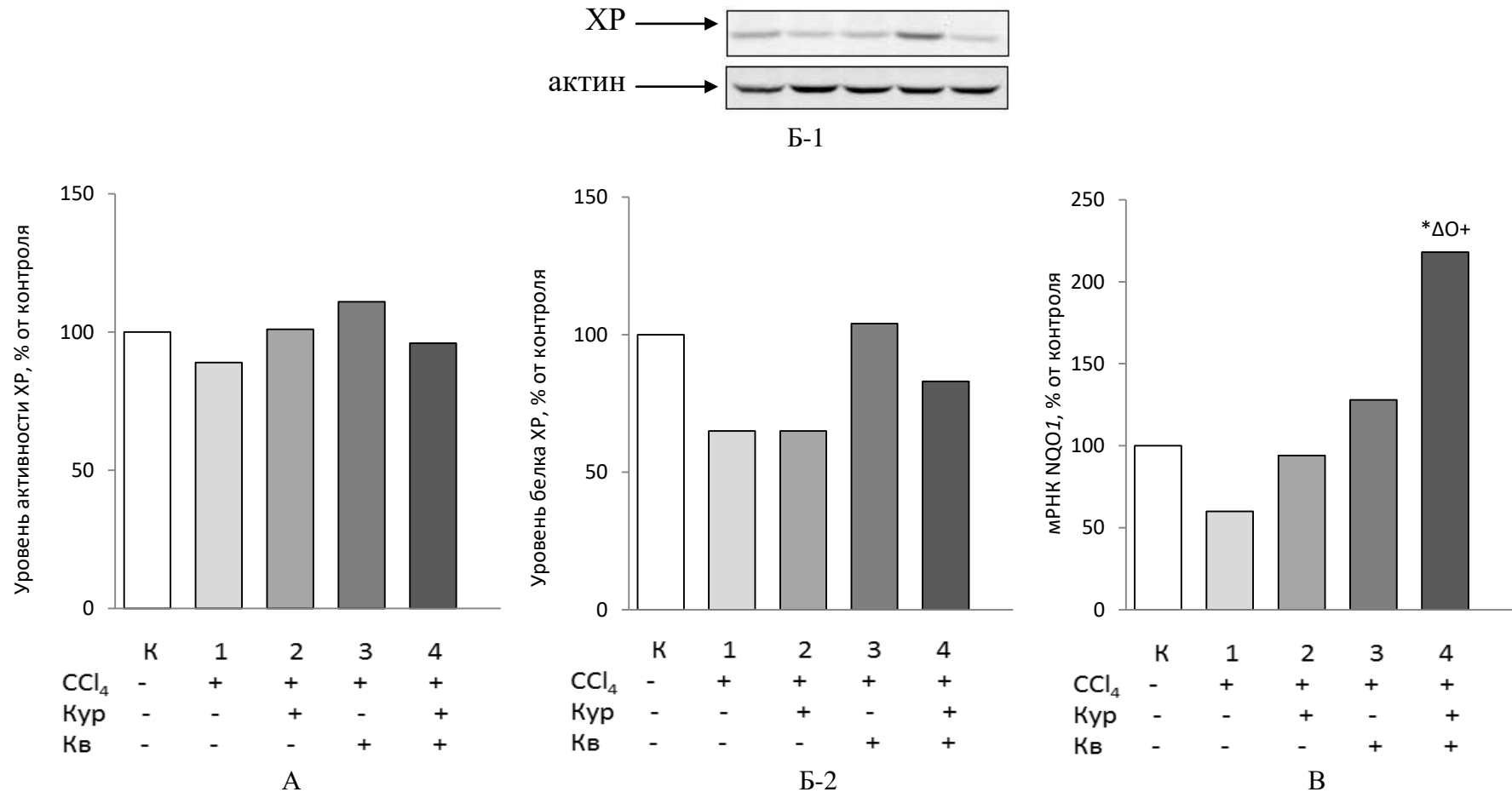
Вестерн-блот анализ цитозольной фракции печени показал, что острое токсическое действие CCl_4 (1-я опытная группа) вызывало снижение уровня белка ХР на 35% относительно контроля ($p>0,05$), также как у крыс, получавших рацион с Кур (2-я опытная группа). Включение в рацион Кв (3-я опытная группа), в отличие от Кур, восстанавливало сниженный CCl_4 уровень белка ХР до контрольных значений. Совместное введение Кур и Кв (4-я опытная группа) приводило к возрастанию экспрессии белка ХР - на 28% ($p>0,05$) относительно уровня экспрессии белка у получавших CCl_4 крыс 1-й опытной группы (Таблица 27, Рисунок 28Б).

Однократное введение CCl_4 приводило к снижению не только уровня белка ХР, но и уровня экспрессии гена *NQO1* на 40% ($p>0,05$) относительно контрольной группы. Введение CCl_4 на фоне рациона с Кур (2-я опытная группа) или с Кв (3-я опытная группа) усиливало экспрессию гена *NQO1* в 1,5 ($p>0,05$) и 2 ($p>0,05$) раза, соответственно. Интересно отметить, что в 4-й опытной группе включение в рацион Кур и Кв совместно оказывало индуцирующее влияние на экспрессию гена *NQO1*, которая превышала уровень экспрессии *NQO1* в 1-й опытной группе в 3,6 раз ($p<0,05$), уровень во 2-й опытной группе - в 2,3 раза ($p<0,05$) и в 3-й опытной группе - в 1,7 раз ($p<0,05$) (Таблица 27, Рисунок 28В).

Таблица 27 – Влияние куркумина и кверцетина на активность ХР, экспрессию белка ХР и гена *NQO1* при их отдельном и совместном действии в условиях острого токсического действия четыреххлористого углерода

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +куркумин +CCl ₄	3-я опытная, +кверцетин +CCl ₄	4-я опытная, +куркумин +кверцетин +CCl ₄
Активность ХР, нмоль/мин•мг белка	229,0±15,8	204,5±27,1	231,0±39,8	253,3±25,8	220,5±27,8
Уровень экспрессии белка ХР	34,8±7,9	22,5±7,6	22,5±5,1	36,3±9,3	28,8±9,3
Уровень экспрессии гена <i>NQO1</i>	1,00	0,60	0,94	1,28	2,18 ^{*ΔO+}

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, Δ - с 1-й опытной группой, O - со 2-й опытной группой, + - с 3-й опытной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии изучаемого белка нормализовали по уровню экспрессии белка сравнения - актин, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения - *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой (CCl₄), О - со 2-й опытной группой (CCl₄+Кур), + - с 3-й опытной группой (CCl₄+Кв).

Рисунок 28 – Активность фермента XP (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка XP (Б-1) и относительное содержание белка XP (Б-2) и уровень мРНК *NQO1* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии куркумина и кверцетина в условиях острого токсического действия четыреххлористого углерода

Как показано в Таблице 28 и на Рисунке 29А в ядерной фракции печени крыс токсическое действие CCl_4 (1-я опытная группа) не влияло на уровень белка Nrf2. Однократное введение CCl_4 на фоне обогащения рациона Кур (2-я опытная группа) вызывало увеличение уровня белка Nrf2 на 33% ($p > 0,05$) относительно 1-й опытной группы. А совместное действие Кур и Кв (4-я опытная группа) снижало на 25% ($p > 0,05$) уровень белка Nrf2 в ядерной фракции относительно 1-й опытной группы.

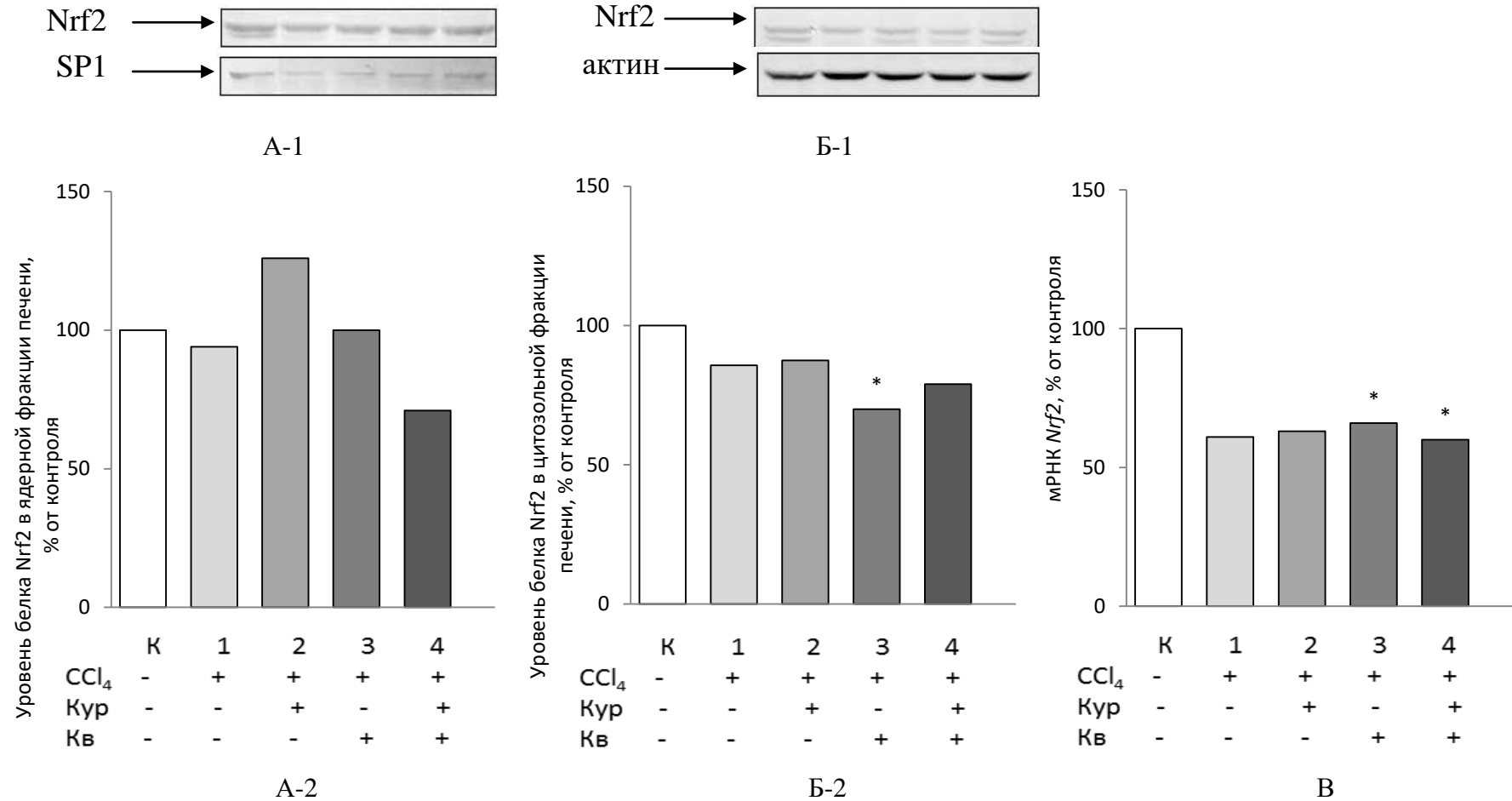
Содержание белка Nrf2 в цитозольной фракции печени крыс в группе с введением CCl_4 (1-я опытная группа) было незначительно ниже, чем в контрольной группе. Включение в рацион Кур (2-я опытная группа) и Кур и Кв (4-я опытная группа) не оказывало значимого воздействия на уровень экспрессии Nrf2 в цитозольной фракции печени (Таблица 28, Рисунок 29Б). Однако, в 3-й опытной группе (Кв+ CCl_4) количество белка Nrf2 достоверно снижалось на 30% относительно контроля.

Согласно результатам ПЦР анализа токсическое действие, вызванное введением CCl_4 , приводило к выраженному снижению уровня мРНК *Nrf2* во всех опытных группах. Так, в 1-й опытной группе содержание мРНК *Nrf2* снижалось на 39% ($p > 0,05$), во 2-й - на 37% ($p > 0,05$), в 3-й - на 34% ($p < 0,05$) и в 4-й опытной группе - на 40% ($p < 0,05$) относительно контрольного уровня (Таблица 28, Рисунок 29В).

Таблица 28 – Влияние куркумина и кверцетина на экспрессию белка Nrf2 в ядерной и цитозольной фракциях и экспрессию гена *Nrf2* при их отдельном и совместном действии в условиях острого токсического действия четыреххлористого углерода

Показатель	Группа животных, рацион				
	Контрольная	1-я опытная, +CCl ₄	2-я опытная, +куркумин +CCl ₄	3-я опытная, +кверцетин +CCl ₄	4-я опытная, +куркумин +кверцетин +CCl ₄
Уровень экспрессии белка Nrf2 в ядерной фракции печени крыс	555,5±145,6	523,8±51,8	701,5±196,8	558,3±38,6	395,3±73,0
Уровень экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции печени крыс	14,0±1,8	12,0±0,7	12,3±0,3	9,8±0,6*	11,0±0,9
Уровень экспрессии гена <i>Nrf2</i>	1,00	0,61	0,63	0,66*	0,60*

Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. В таблице приведены данные экспрессии белка и гена в относительных единицах, уровень экспрессии белка нормализовали по уровню экспрессии белков сравнения: SP1 в ядерной фракции печени крыс и актин – в цитозольной, уровень экспрессии изучаемого гена нормализовали по уровню экспрессии гена сравнения – *Actb*



Примечание – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К)

Рисунок 29 – Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракции печени и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракции печени и уровень мРНК *Nrf2* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии куркумина и кверцетина в условиях острого токсического действия четыреххлористого углерода

Таким образом, полученные результаты показали, что однократное внутрибрюшинное введение CCl_4 приводило к достоверному возрастанию в печени крыс активности ГО-1, экспрессии белка ГО-1 и гена *Hmox1* и, хотя и статистически незначимому, снижению уровня экспрессии белка ХР и экспрессии гена *NQO1*.

Эти результаты хорошо согласуются с ранее полученными данными (см. 4.1). Также, [Кравченко Л.В. и соавт., 2009, Ускова М.А. и соавт., 2009] показали, что индуцированный CCl_4 окислительный стресс вызывает достоверное возрастание в печени крыс активности и экспрессии белка ГО-1, но снижает активность ХР. В исследованиях на крысах разного пола введение CCl_4 в дозе 2 мг/кг м.т. приводило к индукции экспрессии белка ГО-1 и *Nrf2* [Li L. et al., 2017]. У мышей при токсическом действии CCl_4 также наблюдали возрастание активности ГО-1 и экспрессии мРНК *Hmox1* [Peng X. et al., 2018]. В исследовании [Wu T. et al., 2017] у взрослых самцов крыс Sprague-Dawley вызывали гепатотоксичность введением CCl_4 в течение восьми недель (0,3 мл/100 г подкожно два раза в неделю) и обнаруживали выраженное снижение уровня экспрессии белка ХР в печени крыс, получавших CCl_4 по сравнению с контролем. Так же у 5-недельных самцов крыс Sprague-Dawley инъекция 50% CCl_4 масляного раствора (1 мл/кг внутрибрюшинно) вызывала снижение практически в 2 раза уровня мРНК *NQO1* в тканях печени по сравнению с контрольной группой [Han C.Y. et al., 2019]. Как уже отмечали ранее, полагают, что возрастание экспрессии ГО-1 может быть связано с быстрым увеличением концентрации свободного гема в результате повреждающего действия метаболитов CCl_4 на цитохромы P450 [Nakahira K. et al., 2003].

В ряде исследований на крысах [Heeba G.H. et al., 2012; Farombi E. O. et al., 2007, Liu Y. et al., 2015] было показано, что в условиях окислительного стресса антиоксидантное действие Кур и Кв связано с их способностью индуцировать активность ГО-1, как одного из самых чувствительных индикаторов клеточного повреждения и способности клетки к выживанию [Турпаев К.Т. и соавт., 2013; Furfaro A.L. et al., 2016]. Результаты настоящей работы показали, что обогащение

рациона крыс Кур и Кв как отдельно, так и совместно приводило к небольшому снижению индуцирующего действия CCl_4 и возрастанию активности ГО-1, экспрессии белка ГО-1 и гена *Hmox1* относительно контрольного уровня, причем снижение индуцирующего действия CCl_4 было наиболее выраженным в группе при совместном включении Кур и Кв. Данные, полученные на интактных крысах (см. 3.3), свидетельствуют о том, что только совместное включение Кур и Кв в рацион приводило к достоверному усилению активности ГО-1, что может объяснять снижение индуцирующего действия CCl_4 . Интересно отметить, что в аналогичных исследованиях на крысах введение CCl_4 в меньшей дозе - 0,5 мг/кг м.т. на фоне обогащения рациона Кур или Кв приводило к небольшому возрастанию индуцированного введением CCl_4 уровня активности ГО-1 и повышению экспрессии белка ГО-1 в группе у крыс, получавших рацион с содержанием Кв [Балакина А.С., 2016].

Включение в рацион Кв приводило к возрастанию сниженного после введения CCl_4 , уровня экспрессии белка ХР и гена *NQO1* до контрольного уровня, однако эти различия были статистически незначимые. В литературе практически отсутствуют данные о влиянии *in vivo* Кв на активность ХР. В наших исследованиях на интактных крысах (см. 3.3) прослеживалась тенденция к возрастанию активности и экспрессии белка ХР, хотя и статистически недостоверная. Важно отметить, что при совместном включении Кур и Кв отмечали выраженную индукцию экспрессии гена *NQO1* по сравнению со всеми опытными группами, однако корреляции этих данных с изменением активности ХР и экспрессией белка фермента обнаружено не было.

Как показали наши исследования, у крыс в условиях CCl_4 -индуцированного стресса было обнаружено снижение уровня мРНК *Nrf2* во всех опытных группах, что совпадает с данными литературы. Так, в исследованиях на крысах подкожное введение CCl_4 приводило к снижению уровня мРНК *Nrf2* [Cai Z. et al., 2015]. Однократное внутрибрюшинное введение CCl_4 мышам также оказывало ингибирующее влияние на экспрессию *Nrf2* по сравнению с контролем [Zhang J.Q. et al., 2014].

В заключении следует отметить, что в условиях прооксидантного действия CCl_4 совместное обогащение рациона Кур и Кв приводило к снижению индуцирующего влияния CCl_4 на активность, экспрессию белка и гена фермента антиоксидантной защиты ГО-1. Впервые на модели окислительного стресса у крыс получены данные, демонстрирующие синергизм действия Кур и Кв на уровне экспрессии гена *NQO1*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из актуальных направлений современной нутрициологии является определение физиологических потребностей человека в энергии и пищевых веществах. Ключом к сохранению здоровья человека является формирование оптимальной структуры питания. Физиологическая потребность в пищевых веществах или нутриом - это необходимая совокупность алиментарных факторов для поддержания динамического равновесия между окружающей средой и человеком, как сформировавшимся в процессе эволюции биологическим видом, направленная на обеспечение жизнедеятельности, сохранения и воспроизводства вида и поддержания адаптационного потенциала организма, системы антиоксидантной защиты, апоптоза, метаболизма, функции иммунной системы [Тутельян В.А. и соавт., 2020]. В настоящее время накоплен обширный материал, определяющий потребности человека в макронутриентах, таких как белки, липиды и углеводы, и в микронутриентах: витаминах, минеральных веществах и микроэлементах; определен уровень потребления, дифференцированный для различных возрастно-половых групп населения РФ.

Совершенствование и расширение современных представлений о нутриоме включает проведение на молекулярном и клеточном уровнях исследований по расшифровке механизмов регуляции минорных биологически активных компонентов пищи [Тутельян В.А. и соавт., 2020]. В этой связи как объект исследований особый интерес представляют полифенолы - многочисленная группа растительных соединений, обладающих выраженными антиоксидантными свойствами и взаимодействующих с транскрипционными факторами, регулирующих активность различных звеньев защитных систем организма [Vauzour D. et al., 2010; Andriantsitohaina R. et al., 2012; Spagnuolo C. et al., 2012; Alam M. N. et al., 2013; Liu R.H., 2013; Cory H. et al., 2018; Gentile D. et al., 2018; Yahfoufi N. et al., 2018; Williamson G. et al., 2018; Guven H. et al., 2019].

Особое значение для процессов адаптации имеют связанные общими путями регуляции и взаимодействующие между собой полифункциональные

системы, обеспечивающие защиту клетки от повреждающего действия экзогенных и эндогенных факторов – система суперсемейства цитохромов P-450 (ферменты I фазы метаболизма ксенобиотиков), ферменты II фазы метаболизма ксенобиотиков (ферменты конъюгации) и системы антиоксидантной защиты. В настоящее время установлено, что ключевыми факторами регуляции экспрессии генов ферментов и других компонентов этих систем являются транскрипционные факторы AhR и Nrf2.

Уточнение качественного состава нутриома человека предполагает проведение фундаментальных исследований, направленных на выяснение физиологической роли минорных БАВ, эссенциальность которых для организма человека является на данном этапе развития нутрициологической науки, неустановленной. Следует отметить, что в настоящее время происходит интенсивное накопление данных о свойствах и молекулярных механизмах биологической активности отдельных полифенольных и индольных представителей БАВ и имеются лишь единичные сведения об их взаимодействии при совместном поступлении в организм [Krajka-Kuźniak V. et al., 2021], при этом сочетанные эффекты БАВ на AhR- и Nrf2-регулируемые ферменты метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты в условиях *in vivo* остаются практически неизученными.

Полученные результаты показали, что включение в рацион здоровых интактных крыс Р вызывает достоверное возрастание в печени активности, количества белка и экспрессии гена ГО-1, а также увеличение активности и уровня белка ХР, причем при совместном введении Р и Гес наблюдался аддитивный эффект на экспрессию белка ГО-1. Только совместное включение в рацион Кв и Рес сопровождалось возрастанием активности и увеличением количества белка ХР. Важно отметить, что Рес, так же как Кв совместно с Рес, достоверно индуцируют экспрессию гена *Nrf2*. Также было обнаружено статистически значимое возрастание активности ГО-1 при совместном включении в рацион здоровых интактных крыс И-3-К и ЭГКГ.

Как показали наши исследования, на модели острого токсического действия CCl_4 , Р и его комбинация с Гес индуцировали экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты *Hmox1* и *NQO1*. Совместное обогащение рациона Кур и Кв приводило к снижению индуцирующего влияния CCl_4 на активность фермента, экспрессию белка и гена ГО-1. Впервые на модели окислительного стресса у крыс получены данные, демонстрирующие синергизм действия Р и Гес, а также Кур и Кв на уровне экспрессии гена фермента *NQO1*.

Таким образом, установлено, что БАВ пищи полифенольной и индольной природы могут оказывать стимулирующее влияние на молекулярные механизмы, лежащие в основе защитно-адаптационного потенциала организма – на активность и экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты: гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы, через сигнальный механизм Nrf2/Keap1/ARE и на посттранскрипционном уровне. Обнаружено, что комбинированное действие биологически активных веществ пищи может в значительной степени модулировать их индивидуальные эффекты (Рисунок 30).

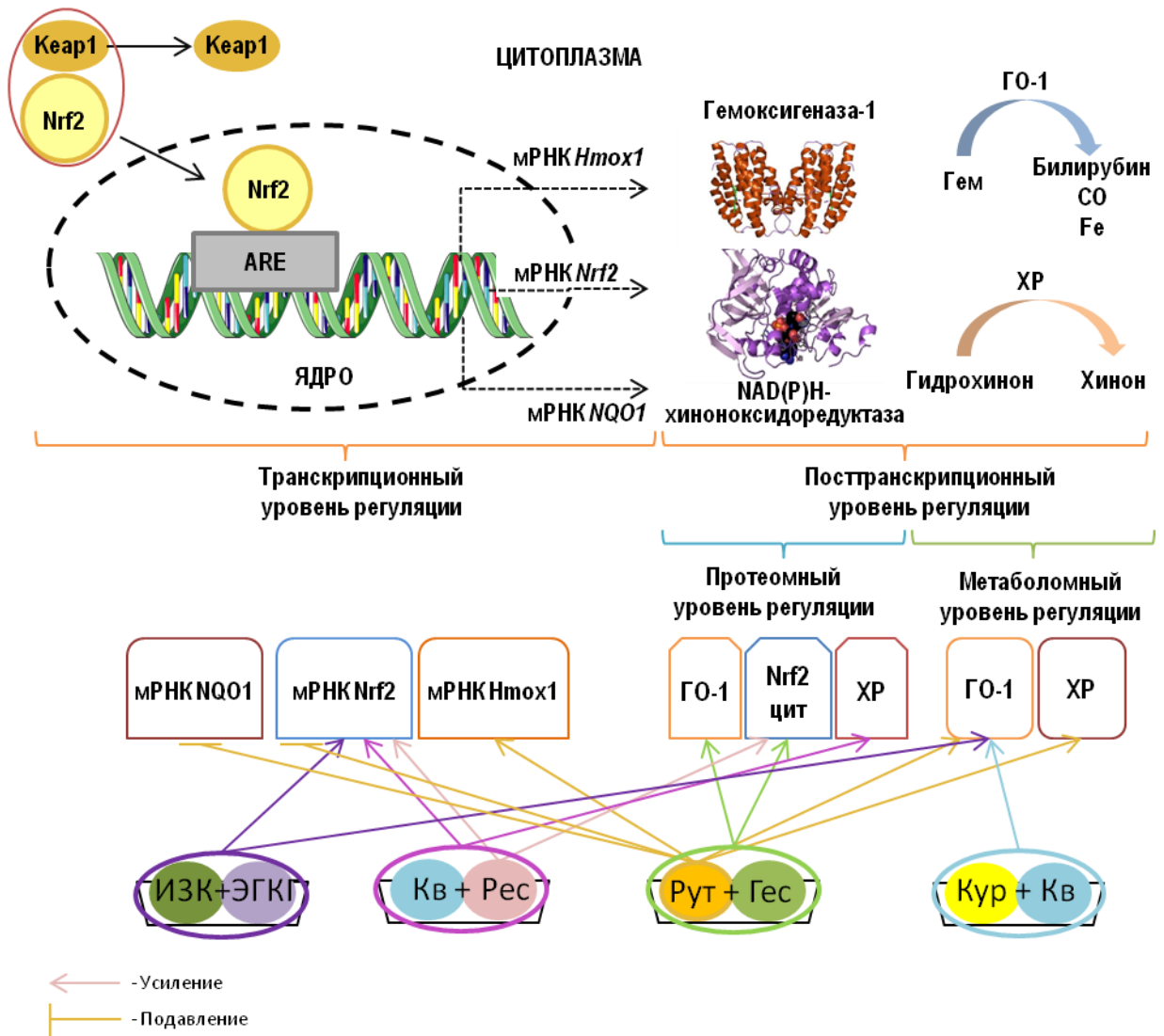


Рисунок 30 – Схема сочетанного и индивидуального действия биологически активных веществ пищи – полифенолов различных классов и индол-3-карбинола на активность Nrf2-регулируемых ферментов на трех уровнях регуляции: транскрипционный, протеомный, метаболомный

ВЫВОДЫ

1. Впервые в исследованиях *in vivo* на крысах Вистар установлена важная роль минорных биологически активных веществ пищи – полифенолов различных классов и индол-3-карбинола в регуляции активности ключевых ферментов системы антиоксидантной защиты: гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазу путем влияния на экспрессию их генов, синтез белков, а также экспрессии гена транскрипционного фактора Nrf2.
2. Включение в рацион здоровых интактных крыс рутина вызывает достоверное возрастание в печени активности гемоксигеназы-1 (на 28%) и экспрессии гена *Hmox1* (на 35%), а также увеличение активности NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы (на 61%) с одновременным достоверным снижением экспрессии гена NQO1 и Nrf2 (на 35% и 27% соответственно). Сочетанное действие рутина и гесперидина приводит к аддитивному эффекту на экспрессию белка гемоксигеназы-1 (рост на 123%) по сравнению с контролем, а также возрастанию уровня мРНК Nrf2 по сравнению с другими опытными группами, что сопровождается достоверным увеличением экспрессии белка Nrf2 в цитозольной фракции печени крыс (на 46%).
3. Показано, что кверцетин и ресвератрол при отдельном введении в указанных дозах не оказывают влияния на активность, экспрессию белка и гена гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы. В то же время их совместное включение в рацион сопровождается резким возрастанием (в 4 раза) количества белка NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы. Кверцетин и ресвератрол как отдельно, так и совместно изменяют перераспределение белка Nrf2 между ядром и цитоплазмой. Происходит смещение уровня Nrf2 в ядерной фракции (на 38%, 52% и 38%, соответственно) и возрастание в цитоплазматической во всех опытных группах, но статистически значимо только при включении ресвератрола (на 64%). Увеличение уровня Nrf2 в цитоплазматической фракции приводит к увеличению скорости транскрипции и, как следствие, к увеличению количества

мРНК Nrf2 (на 26% и 20%, соответственно) в группах животных, получавших только ресвератрол и кверцетин совместно с ресвератролом.

4. Включение в рацион по отдельности куркумина или кверцетина не влияет на активность, уровни белка и мРНК гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы, в то время как их совместное действие характеризуется синергическим повышением активности гемоксигеназы-1 (на 33%) без изменения количества её белка и уровня экспрессии её гена.

5. Установлено, что индол-3-карбинол, равно как и эпигаллокатехингаллат, по отдельности приводят к незначительному возрастанию активности гемоксигеназы-1 и достоверному снижению экспрессии гена *Hmox1* на (37% и 45% соответственно), сопровождающееся снижением экспрессии гена *Nrf2* (20% и 33% соответственно). В тоже время их совместное введение приводит к достоверному повышению активности гемоксигеназы-1 (на 29%) и достоверному возрастанию экспрессии гена *Nrf2* до контрольного уровня.

6. На модели окислительного стресса, индуцированного интоксикацией крыс четыреххлористым углеродом, выявлено существенное возрастание в печени активности гемоксигеназы-1, уровня её белка и экспрессии её гена. В отличие от этого, уровень белка NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы и экспрессия её гена характеризованы снижением, в некоторых случаях, не достигая уровня достоверности.

7. Впервые показано, что рутин и гесперидин, как отдельно, так и совместно, снижают уровень окислительного стресса, индуцированного четыреххлористым углеродом. Причем рутин приводит к возрастанию относительно контрольного уровня количества мРНК гемоксигеназы-1 (на 80%), а гесперидин – активности фермента (на 95%). Совместное действие рутина и гесперицина сопровождается достоверным возрастанием в печени как активности, так и экспрессии гена гемоксигеназы-1 (на 102% и на 70%, соответственно). Сниженная при интоксикации четыреххлористым углеродом экспрессия гена NAD(P)H-

хиноноксидоредуктазы восстанавливается до уровня, превышающего контрольный на 60% при обогащении рациона только рутином и на 140% - рутином совместно с гесперидином.

8. Установлено, что введение четыреххлористого углерода крысам, получавшим совместно куркумин и кверцетин, приводит к возрастанию уровня экспрессии гена NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы в 3,6 раз относительно животных, содержащихся на рационах без добавления флавоноидов.

9. Эффекты полифенольных соединений и индол-3-карабинола, широко распространенных в растительной пищевой продукции и БАДах, реализуются на уровне экспрессии белков и генов антиоксидантных ферментов: гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы, через сигнальный механизм Nrf2/Keap1/ARE и на посттранскрипционном уровне.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК -- активные формы кислорода

БАВ – биологически активные вещества

ГАФДГ – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

Гес – гесперидин

ГО-1 – гемоксигеназа-1

И-3-К – индол-3-карбинол

Кур – куркумин

МДА – малоновый диальдегид

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

Р – рутин

Рес – ресвератрол

ХР – NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза

ЭГКГ – эпигаллокатехингаллат

AhR – рецептор ароматических углеводов

ARE – антиоксидант-респонсивный элемент

CCl₄ – четыреххлористый углерод

Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1

Nrf2 – NF-E2-ассоциированный фактор 2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Авреньева Л.И., Балакина А.С., Трусов Н.В., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Кравченко Л.В. Эффекты отдельного и сочетанного поступления кверцетина и ресвератрола на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты у крыс // Материалы XVI Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием. Вопросы питания. - 2016. – Т.85, №4.- с.101
- 2 Аксенов И.В., Балакина А.С., Трусов Н.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Кравченко Л.В. Эффекты отдельного и сочетанного поступления куркумина и кверцетина на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков и антиоксидантной защиты у крыс // Материалы XVI Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием. Вопросы питания. - 2016. – Т.85, №4.- с.100
- 3 Балакина А.С. Влияние куркумина и кверцетина на активность гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы при остром токсическом действии четыреххлористого углерода // Материалы школы молодых ученых: Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. -2016. - С. 18-22.
- 4 Балакина А.С. Влияние куркумина и кверцетина на активность гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы при остром токсическом действии четыреххлористого углерода // Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. Сборник материалов Школы молодых ученых. Москва. 2016. С. 18-22.
- 5 Балакина А.С. Влияние рутина и гесперидина на сигнальную систему Nrf2/ARE крыс при остром токсическом действии четыреххлористого углерода // Вопросы питания. - 2016. - Т. 85, № S2. - С. 22-23
- 6 Балакина А.С. Минорные биологически активные вещества пищи в регуляции системы антиоксидантной защиты организма // Материалы республиканской научной конференции: современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии.- 2022. – с. 54-56.

- 7 Балакина А.С., Аксенов И.В., Трусов Н.В., Гусева Г.В., Авреньева Л.И., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Влияние куркумина и кверцетина на показатели защитного потенциала крыс при их отдельном и совместном действии // Вопросы питания. – 2017. – Т.86, №2 – С. 14-22.
- 8 Балакина А.С., Девятов А.А., Трусов Н.В. Оценка фактического потребления минорных биологически активных соединений фенольной природы в некоторых странах // Материалы II школы молодых ученых: основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. - 2019. - с. 13-14.
- 9 Балакина А.С., Трусов Н.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Влияние рутина и гесперидина на экспрессию гена Nrf2 и активность гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы при их отдельном и совместном действии // Вопросы питания. – 2016. - Т. 85, №3. – С. 18-26.
- 10 Балакина А.С., Трусов Н.В., Аксенов И.В., Гусева Г.В., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Влияние рутина и гесперидина на экспрессию гена Nrf2- и AhR-контролируемых генов и гена CYP3A1 у крыс при остром токсическом действии четыреххлористого углерода // Вопросы питания. – 2016. – Т.85, №5. – С. 28-35.
- 11 Балакина А.С., Трусов Н.В., Гусева Г.В., Авреньева Л.И., Аксенов И.В., Кравченко Л.В. Роль биологически активных веществ пищи в поддержании защитно-адаптационного потенциала // Материалы XII всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей: российская гигиена - развивая традиции, устремляемся в будущее. - 2017. - с. 22-25.
- 12 Зиновкин Р.А., Кондратенко Н.Д., Зиновкина Л.А. Является ли Nrf2 основным регулятором старения млекопитающих? (обзор) // Биохимия. 2022. Т. 87, № 12. С. 1842-1855
- 13 Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Аксенов И.В. и др. Изучение влияния рутина на защитный потенциал крыс // Вопросы питания. 2015. № 3. С. 22-30.

- 14 Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Аксенов И.В., Балакина А.С., Гусева Г.В., Трусков Н.В. Изучение влияния рутина на защитный потенциал крыс // Вопросы питания. - 2015. - Т. 84, № 3. - С. 22-30.
- 15 Кравченко Л.В., Трусков Н.В., Аксенов И.В. и др. Влияние экстракта зеленого чая и его компонентов на антиоксидантный статус и активность ферментов метаболизма ксенобиотиков у крыс // Вопросы питания. 2011. №2. С. 9-15.
- 16 Кравченко Л.В., Трусков Н.В., Аксенов И.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Лашнева Н.В., Тутельян В.А. Влияние экстракта зеленого чая и его компонентов на антиоксидантный статус и активность ферментов метаболизма ксенобиотиков у крыс // Вопросы питания. 2011. Т. 80, № 2. С. 9-15.
- 17 Кравченко Л.В., Трусков Н.В., Ускова М.А. и др. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса // Токсикол. Вестн. 2009. № 1. С. 12-18.
- 18 Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент // Биохимия. 2006. № 9. С. 1183-1197.
- 19 Меньщикова Е.Б. и др. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. 284 с.
- 20 Попова А.Ю., Тутельян В.А., Никитюк Д.Б. О новых (2021) Нормах физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации // Вопросы питания. 2021. Т 90, № 4. С. 6-19.
- 21 Таратонов А.В., Жаров А.В., Губайдуллина Т.Н. и др. Комплексное лечение больных с распространенными формами рака яичников с включением препарата промисан // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2013. № 4. с. 20-24.
- 22 Ткачев В.О., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Механизм работы сигнальной системы Nrf2/Keap1/ARE. Обзор // Биохимия. 2011. Т. 76, № 4. С. 502–519.

- 23 Трусов Н.В., Балакина А.С. Влияние отдельного и совместного поступления в организм крыс индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на активность и экспрессию генов ферментов метаболизма ксенобиотиков // Материалы всероссийской конференции молодых ученых с международным участием: актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи.- 2017. - с. 138-142.
- 24 Трусов Н.В., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Авреньева Л.И., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Эффекты комбинированного действия ресвератрола и индол-3-карбинола // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 2. С. 174-179.
- 25 Трусов Н.В., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Балакина А.С., Авреньева Л.И., Кравченко Л.В. Влияние эпигаллокатехингаллата на индуцибельность цитохромов P450 у крыс // Материалы XVI Всероссийского Конгресса диетологов и нутрициологов с международным участием. Вопросы питания. - 2016. – Т.85, №4. с.110-111
- 26 Турпаев К.Т. Сигнальная система Keap1-Nrf2. Механизм регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений // Биохимия. 2013. № 2. С.147-166.
- 27 Тутельян В.А., Лашнева Н.В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Флаваноны: пищевые источники, биодоступность, влияние на ферменты метаболизма ксенобиотиков // Вопросы питания. 2011. Т. 80, № 5. С. 4-23.
- 28 Тутельян В.А., Лашнева Н.В. Биологически активные вещества растительного происхождения. Флавонолы и флавоны: распространенность, пищевые источники, потребление // Вопросы питания. 2013. Т. 82, № 1. С. 4-22.
- 29 Тутельян В.А., Никитюк Д.Б., Батурич А.К., Васильев А.В., Гаппаров М.М.Г, Жилинская Н.В., Жминченко В.М., Камбаров А.О., Коденцова В.М., Кравченко Л.В., Кулакова С.Н., Лашнева Н.В., Мазо В.К., Соколов А.И., Суханов Б.П., Хотимченко С.А. Нутриом как направление "главного удара": определение физиологических потребностей в макро- и микронутриентах,

- минорных биологически активных веществах пищи // Вопросы питания. 2020. Т 89, № 4. С. 24-34.
- 30 Ускова М.А., Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Тутельян В.А. Влияние пробиотика *Lactobacillus casei* 114001 на биологическую активность рутина // Бюлл. exper. биол. и мед. 2010. № 5. С. 510-515.
- 31 Aalikhani M., Safdari Y., Jahanshahi M., Alikhani M., Khalili M. Comparison between hesperidin, coumarin, and deferoxamine iron chelation and antioxidant activity against excessive iron in the iron overloaded mice // Front. Neurosci. 2021. Vol. 15, article number 811080.
- 32 Aggarwal B. B., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H. Curcumin: The Indian solid gold // Advances in Experimental Medicine and Biology. 2007. № 595. P. 1–75.
- 33 Ahmed O.M., AbouZid S.F., Ahmed N.A., Zaky M.Y., Liu H. An up-to-date review on citrus flavonoids: chemistry and benefits in health and disease // Current Pharmaceutical Design. 2021. Vol. 27, № 4. P. 513–530.
- 34 Ahmed O.M., et al. Rutin and quercetin counter doxorubicin-induced liver toxicity in wistar rats via their modulatory effects on inflammation, oxidative stress, apoptosis, and Nrf2 // Oxid Med Cell Longev. 2022. Vol. 2022, article number 2710607.
- 35 Aires V. et al. 2014. Stilbenes and resveratrol metabolites improve mitochondrial fatty acid oxidation defects in human fibroblasts // Orphanet Journal of Rare Diseases. 2014. Vol. 9. № 79. P. 1-13.
- 36 Akkiraju S. et al. Cardioprotective potential of indol-3-carbinol against high salt induced myocardial stress and hypertrophy in Sprague dawley rats besides molecular docking on muscarinic receptor-2 // Nat. Prod. Res. 2022. Vol. 36, № 10. P. 2610-2614.
- 37 Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity // Saudi Pharmaceutical Journal. 2013 Vol. 21, № 2. P. 143–152.
- 38 Alamolhodaei N.S. et al. Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: An overview // Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published

- for the British Industrial Biological Research Association. 2017. Vol. 103. P. 223–232.
- 39 Alhoshani A.R. et al. Protective effect of rutin supplementation against cisplatin-induced Nephrotoxicity in rats // *BMC Nephrology*. 2017. Vol. 18, № 1. P. 194.
- 40 Andriantsitohaina R. et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols // *Br. J. Nutr.* 2012. Vol. 108. P. 1532–1549.
- 41 Arias N. et al. A combination of resveratrol and quercetin induces browning in white adipose tissue of rats fed an obesogenic diet // *Obesity (Silver Spring)*. 2017. Vol. 25, № 1. P. 111-121.
- 42 Astha M., Ginpreet K., Piperine M.C. Quercetin enhances antioxidant and hepatoprotective effect of curcumin in paracetamol induced oxidative stress // *Int. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 8. p. 101–7.
- 43 Athale J. et al. Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 53. P. 1584–1594.
- 44 Avadhani K.S. et al. Skin delivery of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and hyaluronic acid loaded nano-transfersomes for antioxidant and anti-aging effects in UV radiation induced skin damage // *Drug Deliv.* 2017. Vol. 24, № 1. P. 61-74.
- 45 Bansal S., Biswas G., Avadhani N.G. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity // *Redox Biol.* 2014. Vol. 2. P. 273–283.
- 46 Batiha G.E. et al. The Pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: quercetin. *Foods*. 2020. Vol. 9, № 3. P. 374.
- 47 Bellezza I. et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* 2018. Vol. 1865, № 5. P. 721-733.
- 48 Benson A.M., Hunkeler M.J., Talalay P. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. Vol. 77, N 9. P. 5216-5220.

- 49 Benvenuto M., Albonici L., Focaccetti C., et al. Polyphenol-Mediated Autophagy in Cancer: Evidence of In Vitro and In Vivo Studies // *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, № 18. P. 6635.
- 50 Biesaga M., Pyrzynska K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods // *Food Chem.* 2013. Vol. 136. P. 46–54.
- 51 Bindu S. et al. Translocation of heme oxygenase-1 to mitochondria is a novel cytoprotective mechanism against non-steroidal anti-inflammatory drug-induced mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and gastric mucosal injury // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. P. 39387–39402
- 52 Biswas C. et al. Nuclear Heme Oxygenase-1 (HO-1) Modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 39. P. 26882–26894.
- 53 Bolisetty S. et al. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 decreases oxidative stress in renal epithelial cells // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2013. Vol. 305. P. F255–F264.
- 54 Brieger K. et al. Reactive oxygen species: from health to disease // *Swiss Med. Wkly.* 2012. Vol. 142. P.w13659.
- 55 Bruins M.J., Van Dael P., Eggersdorfer M. the role of nutrients in reducing the risk for noncommunicable diseases during aging // *Nutrients.* 2019. Vol. 11, N 1. P. 85.
- 56 Bryan H.K. et al. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation // *Biochem. Pharmacol.* 2013. Vol. 85. P. 705–717.
- 57 Cai Z. et al. N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8, № 7. P. 8655-62.
- 58 Casas-Grajales S., Muriel P. Antioxidants in liver health // *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* 2015. Vol. 6, N 3. P. 59-72.
- 59 Catalgol B. et al. Resveratrol: French paradox revisited // *Front Pharmacol.* 2012. Vol. 3. P. 141.

- 60 Chen C.Y. et al. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells // *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. Vol. 331. N. 4. P. 993-1000.
- 61 Chen L. et al. Intracellular signaling pathways of inflammation modulated by dietary flavonoids: The most recent evidence // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018. Vol. 58, N 17. P. 2908-2924.
- 62 Chen M. et al. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes // *Food Chem. Toxicol.* 2010. Vol. 48, N 10. P. 2980-2987.
- 63 Chen M.C., Ye Y.Y., Ji G., Liu J.W. Hesperidin upregulates heme oxygenase1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells // *J. Agric. Food Chem.* 2010. Vol. 58, N 6. P. 3330-3335.
- 64 Choi S. J. et al. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*) // *Food Science and Biotechnology.* 2012. Vol. 21, N 2. P. 587–595.
- 65 Chomczynski P., Sacchi N. Single-step of RNA isolation by aced guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analytical Biochemistry.* 1987. Vol. 162. P. 156-159
- 66 Chora A.A. et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation // *J. Clin. Invest.* 2007. Vol. 117. P. 438–447.
- 67 Chowdhry S. et al. Nrf2 Is Controlled by Two Distinct β -TrCP Recognition Motifs in its Neh6 Domain, One of Which Can Be Modulated by GSK-3 Activity // *Oncogene.* 2013. Vol. 32, N 32. P. 3765–3781.
- 68 Chua L.S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities // *J. Ethnopharmacol.* 2013. Vol. 150, N 3. P. 805-817
- 69 Converso D.P. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism // *Faseb. J.* 2006. Vol. 20. P. 1236–1238.
- 70 Cory H. et al. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review // *Front Nutr.* 2018. Vol. 5. P. 87.

- 71 Covas G. et al. Activation of Nrf2 by H₂O₂: de novo synthesis versus nuclear translocation // *Methods Enzymol.* 2013. Vol. 528. P. 157-71.
- 72 Cretu E. et al. Plant-derived anticancer agents - curcumin in cancer prevention and treatment // *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* 2012. Vol. 116, N. 4. P. 1223-9.
- 73 Cruse I., Maines M.D. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes // *J. Biol. Chem.* 1988. vol. 263. P. 3348–3353.
- 74 Cuadrado A., Kuegler S., Lastres-Becker I. Pharmacological targeting of GSK-3 and NRF2 provides neuroprotection in a preclinical model of tauopathy // *Redox Biol.* 2018. Vol. 14. P. 522–534.
- 75 de Araújo M. E. et al. Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities // *Food Chemistry.* 2013. Vol. 141, N 1. P. 266–273.
- 76 De la Lastra C.A, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications // *Biochem Soc Trans.* 2007. Vol. 35, № Pt 5. P. 1156-60
- 77 Di Donna L. et al. Rapid assay of resveratrol in red wine by paper spray tandem mass spectrometry and isotope dilution // *Food Chem.* 2017. Vol. 229. P. 354-357.
- 78 Di T.Q. et al. Curcumin Improves the Renal Autophagy in Rat Experimental Membranous Nephropathy via Regulating the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 Signaling Pathways // *Biomed. Res. Int.* 2020. Vol. 2020. P. 7069052.
- 79 Dinkova-Kostova A.T., Kostov R.V., Canning P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants // *Arch Biochem Biophys.* 2017. Vol. 617. P. 84-93.
- 80 Diplock A.T. et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document // *British J. Nutr.* 1999. Vol. 81, N 1. P. s1-s27.
- 81 Durazzo A., Lucarini M., Souto E.B. et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health // *Phytother Res.* 2019. Vol. 33, N 9. P. 2221-2243.
- 82 Domitrovic R. et al. Differential hepatoprotective mechanisms of rutin and quercetin in CCl₄-intoxicated BALB/cN mice // *Acta Pharmacol. Sinica.* 2012. Vol. 33, N 10. P. 1260-1270.

- 83 Dunn L.L. et al. New insights into intracellular locations and functions of heme oxygenase-1 // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. Vol. 20. P.1723–1742.
- 84 Dyrtrtova J. J. et al. Does resveratrol retain its antioxidative properties in wine? Redox behaviour of resveratrol in the presence of Cu(II) and tebuconazole // *Food Chemistry.* 2018. Vol. 262. P. 221–225.
- 85 El Khawand T. et al. Resveratrol transformation in red wine after heat treatment // *Food Res Int.* 2020. Vol. 132. P. 109068.
- 86 Elavarasan J., Velusamy P., Ganesan T. et al. Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart // *J. Pharm. Pharmacol.* 2012. Vol. 64, N 10. P. 1472-1482.
- 87 Elsayy H. et al. Rutin ameliorates carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatorenal toxicity and hypogonadism in male rats // *Peer. J.* 2019. Vol. 7. P. e7011
- 88 Erlank H. et al. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 51, N 12. P. 2319-27.
- 89 Erlund I. et al. Pharmacokinetics of quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2000. Vol. 56, N 8. P. 545-553.
- 90 Esatbeyoglu T. et al. Curcumin--from molecule to biological function // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. Vol. 51, N 22.p. 5308-32.
- 91 Estruel-Amades S. et al. Protective effect of hesperidin on the oxidative stress induced by an exhausting exercise in intensively trained rats // *Nutrients.* 2019. Vol. 11. P. 783.
- 92 Fabjanowicz M., Płotka-Wasyłka J., Namiesnik J. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges // *Trends in Analytical Chemistry.* 2018. Vol. 103. P. 21–33.
- 93 Farombi E.O. et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1 // *Food Chem. Toxicol.* 2008. Vol. 46, N 4. P. 1279-87.
- 94 Felker P., Bunch R., Leung A.M. Concentrations of thiocyanate and goitrin in human plasma, their precursor concentrations in brassica vegetables, and associated potential risk for hypothyroidism // *Nutr. Rev.* 2016. Vol. 74, N 4. P. 248-58.

- 95 Foshati S. et al. Antioxidants and clinical outcomes of patients with coronavirus disease 2019: A systematic review of observational and interventional studies // *Food Sci. Nutr.* 2022. N 10.1002/fsn3.3034.
- 96 Fujiki H. et al. Primary cancer prevention by green tea, and tertiary cancer prevention by the combination of green tea catechins and anticancer compounds // *J. Cancer. Prev.* 2015. Vol. 20. P. 1–4.
- 97 Furfaro A.L. et al. Role of Nrf2, HO-1 and GSH in neuroblastoma cell resistance to bortezomib // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, N 3. P. e0152465.
- 98 Gentile D. et al. Dietary flavonoids as a potential intervention to improve redox balance in obesity and related co-morbidities: A review // *Nutrition Research Reviews.* 2018. Vol. 31. P. 239-247.
- 99 Giuliani C. et al. Resveratrol has anti-thyroid effects both in vitro and in vivo // *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association.* 2017. Vol. 107, N. Pt A. P. 237–247.
- 100 Gozzelino R., Jeney V., Soares M.P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1 // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010. Vol. 50. P. 323–354.
- 101 Gullon B. et al. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability // *Trends in Food Science and Technology.* 2017. Vol. 67. P. 220–235.
- 102 Guo Y., Bruno R. S. Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability // *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2015. Vol. 26, N 3. P. 201–210.
- 103 Guven H., Arici A., Simsek O. Flavonoids in Our Foods // A Short Review *J. Basic Clin. Health Sci.* 2019. Vol. 3. P. 96-106.
- 104 Hafez M.M. et al. Association between paraoxonases gene expression and oxidative stress in hepatotoxicity induced by CCl₄ // *Oxid Med Cell Longev.* 2014. Vol. 2014. P. 893212.
- 105 Hajjalyani M. et al. Hesperidin as a neuroprotective agent: a review of animal and clinical evidence // *Molecules.* 2019. Vol. 24, N 3. P. 648.

- 106 Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress // Biochemical Society Transactions. 2007. Vol. 35, N 5. P. 1147–1150.
- 107 Han C.Y. et al. Berberine ameliorates CCl₄-induced liver injury in rats through regulation of the Nrf2-Keap1-ARE and p53 signaling pathways // Mol Med Rep. 2019. Vol. 20, N 4. P. 3095-3102.
- 108 Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism // Trends Biochem Sci. 2014. Vol. 39, N 4. P. 199-218.
- 109 He J.Z. et al. Enhanced translation of heme oxygenase-2 preserves human endothelial cell viability during hypoxia // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 9452–9461.
- 110 He Y. et al. Resveratrol improves prostate fibrosis during progression of urinary dysfunction in chronic prostatitis // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2017. Vol. 54. P. 120–124.
- 111 Heeba G.H., Mahmoud M.E., El Hanafy A.A. Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF- α // Toxicol. Ind. Health. 2014. Vol. 30, N 6. P. 551-560.
- 112 Herb M., Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity // Antioxidants (Basel). 2021. Vol. 10, N 2. P. 313.
- 113 Hewlings S. J., Kalman. D. S. Curcumin: A review of its' effects on human health // Foods. 2017. Vol. 6, N 10. P. E92.
- 114 Holmström K. M. et al. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration // Biol. Open. 2013. Vol. 2. P. 761–770.
- 115 Hong Y., An Z. Hesperidin attenuates learning and memory deficits in APP/PS1 mice through activation of Akt/Nrf2 signaling and inhibition of RAGE/NF-kappaB signaling // Arch. Pharm. Res. 2018. Vol. 41, N 6. P. 655-663.
- 116 Hu R., Kim B.R., Chen C. The roles of JNK and apoptotic signaling pathways in PEITC-mediated responses in human HT-29 colon adenocarcinoma cells // Carcinogenesis. 2003. Vol. 24. P. 1361 - 1367.

- 117 Hu Y., Li Y., Zhang W., Kou G., Zhou Z. Physical stability and antioxidant activity of citrus flavonoids in arabic gum-stabilized microcapsules: Modulation of whey protein concentrate // *Food Hydrocoll.* 2018. Vol. 77. P. 588–597.
- 118 Hursel R. et al. The effects of catechin rich teas and caffeine on energy expenditure and fat oxidation: a meta-analysis // *Obes. Rev.* 2011. Vol. 12. P. e573–81.
- 119 Jagadeesh A.S.V. et al. Non-canonical vs. Canonical Functions of Heme Oxygenase-1 in Cancer // *J. Cancer Prev.* 2022. Vol. 27, N 1. P. 7-15.
- 120 Jain A.K., Bloom D.A., Jaiswal A.K. Nuclear import and export signals in control of Nrf2 // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 32. P. 29158-68.
- 121 Ji L.L. et al. The involvement of p62-Keap1Nrf2 antioxidative signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. Vol. 85. P. 12-23.
- 122 Johmura Y. et al. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders // *Science.* 2021. Vol. 371. P. 265–270.
- 123 Jung N.H. et al. Evidence for heme oxygenase-1 association with caveolin-1 and -2 in mouse mesangial cells // *IUBMB Life.* 2003. Vol. 55. P. 525–532.
- 124 Kalender Y. et al. Protective effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats // *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012. Vol. 33, N 2. P. 141-8.
- 125 Kaur G., Invally M., Chintamaneni M. Influence of piperine and quercetin on antidiabetic potential of curcumin // *J. Complement Integr. Med.* 2016. Vol. 13, N 3. P. 247-255.
- 126 Khajevand-Khazaei M.R. et al. Rutin, a quercetin glycoside, alleviates acute endotoxemic kidney injury in C57BL/6 mice via suppression of inflammation and up-regulation of antioxidants and SIRT1 // *European Journal of Pharmacology.* 2018. Vol. 833. P. 307–313.
- 127 Khan N., Mukhtar H. Tea Polyphenols in Promotion of Human Health // *Nutrients.* 2018. Vol. 11, N 1. p. 39.

- 128 Khan R.A., Khan M.R., Sahreen S. Attenuation of CCl₄-induced hepatic oxidative stress in rat by *Launaea procumbens* // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2013. Vol. 65, N 3. P. 319-326.
- 129 Khan R.A., Khan M.R., Sahreen S. CCl₄-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat // *BMC Complement. Altern. Med.* 2012. doi: 10.1186/1472-6882-12-178.
- 130 Kim H.P. et al. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells // *Faseb. J.* 2004. Vol. 18. P. 1080–1089.
- 131 Kim H.S., Quon M.J., Kim J.A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate // *Redox Biol.* 2014. Vol. 2. P. 187-195.
- 132 Kobori M. et al. Chronic high intake of quercetin reduces oxidative stress and induces expression of the antioxidant enzymes in the liver and visceral adipose tissues in mice // *Journal of Functional Foods* 2015. Vol. 15. P. 551–560.
- 133 Kocaadam B., Sanlier N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2017. Vol. 57, N 13. P. 2889–2895.
- 134 Kovac S. et al. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1850. P. 794–801.
- 135 Krajka-Kuźniak V. et al. Modulation of rat hepatic and kidney phase II enzymes by cabbage juices: comparison with the effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate // *Br. J. Nutr.* 2011. Vol. 105, N 6. P. 816-26.
- 136 Krajka-Kuźniak V., Baer-Dubowska W. Modulation of Nrf2 and NF-κB Signaling Pathways by Naturally Occurring Compounds in Relation to Cancer Prevention and Therapy. Are Combinations Better Than Single Compounds? // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, N 15. P. 8223.
- 137 Kumar S., Sharma S., Vasudeva N. Screening of antidiabetic and antihyperlipidemic potential of oil from *Piper longue* and piperine with their possible mechanism // *Expert Open Pharmacother.* 2013. Vol. 14. P. 1723–36.

- 138 Kunnumakkara A.B. et al. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases // *Br J Pharmacol.* 2017. Vol. 174, N 11. P. 1325-1348.
- 139 Kwon J. et al. Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62-Keap1-Nrf2-Nqo1 cascade // *EMBO Rep.* 2012. Vol. 13. P. 150–156.
- 140 Lake B.G. Preparation and characterisation of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism // *Biochem. Toxicol.: A Practical Approach.* Oxford. 1987. P. 183-215.
- 141 Lambert J.D. et al. Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues // *Drug. Metab. Dispos.* 2006. Vol. 34, N 1. P. 8-11.
- 142 Lee H., Sung J. Relative protective activities of quercetin, quercetin-3-glucoside, and rutin in alcohol-induced liver injury // *J Food Biochem.* 2019. Vol. 43, N 11. P. e13002.
- 143 Lee H.Y. et al. Turmeric extract and its active compound, curcumin, protect against chronic CCl₄-induced liver damage by enhancing antioxidation // *BMC Complement. Altern. Med.* 2016. Vol. 16, N 1. P. 316.
- 144 Lee J.M. et al. NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, N 39. P. 37948-56.
- 145 Lee S. et al. Relative protective activities of quercetin, quercetin-3-glucoside, and rutin in alcohol-induced liver injury // *J. Food Biochem.* 2019. Vol. 43, N 11. P. e13002.
- 146 Lee Y.J., Lee D.M., Lee S.H. Nrf2 expression and apoptosis in quercetin-treated malignant mesothelioma cells // *Mol. Cells.* 2015. Vol. 38, N 5. P. 416-425.
- 147 Leibelt D.A., Hedstrom O.R., Fischer K.A. et al. Evaluation of chronic dietary exposure to indole-3-carbinol and absorption-enhanced 3,3'-diindolylmethane in sprague-dawley rats // *Toxicol. Sci.* 2003. Vol. 74. P. 10-21.
- 148 Li C. et al. Activation of the KEAP1-NRF2-ARE signaling pathway reduces oxidative stress in Hep2 cells // *Mol. Med. Rep.* 2018. Vol. 18. P. 2541–2550.

- 149 Li C.W. et al. Effect of rutin on liver function and morphology in type 1 diabetes mice induced by streptozotocin // *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*. 2018. Vol. 49. P. 384–387.
- 150 Li L. et al. In vitro and in vivo antioxidative and hepatoprotective activity of aqueous extract of Cortex Dictamni // *World J. Gastroenterol.* 2017. Vol. 23, N 16. P. 2912-2927.
- 151 Li W. et al. Hesperidin, a plant flavonoid accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats: Role of TGF- β /Smads and Ang-1/Tie-2 signaling pathways // *EXCLI J.* 2018. Vol. 7. P.399–419.
- 152 Li W., Yu S.W., Kong A.N. Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, N 37. P. 27251-63.
- 153 Li X. et al. The role of Keap1-Nrf2-ARE signal pathway in diabetic retinopathy oxidative stress and related mechanisms // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2018. Vol. 11. P. 3084–3090.
- 154 Licznerska B. et al. Indole-3-Carbinol and Its Role in Chronic Diseases // *Anti-Inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases*. 2016. P. 131–154.
- 155 Liguori I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases // *Clin. Interv. Aging.* 2018. Vol. 13. P. 757-772.
- 156 Liu C.M. et al. Quercetin protects mouse liver against nickel-induced DNA methylation and inflammation associated with the Nrf2/HO-1 and p38/STAT1/NF-KB pathway // *Food Chem. Toxicol.* 2015. Vol. 82. P. 19-26.
- 157 Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet // *Adv Nutr.* 2013. Vol. 4, N 3. P. 384S-92S.
- 158 Liu Y., Wu Y.M., Zhang P.Y. Protective effects of curcumin and quercetin during benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2015. Vol. 19, N 9. P. 1736-1743.
- 159 Liu Z. et al. Curcumin upregulates Nrf2 nuclear translocation and protects rat hepatic stellate cells against oxidative stress // *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 13, N 2. P. 1717-24.

- 160 Loboda A., Jozkowicz A., Dulak J. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism - targeting HO-1 as an anti-tumor therapy // *Vasc. Pharmacol.* 2015. Vol. 74. P. 11–22.
- 161 Lu C. et al. Curcumin attenuates ethanol-induced hepatic steatosis through modulating Nrf2/FXR signaling in hepatocytes // *IUBMB Life.* 2015. Vol. 67, N 8. P. 645-58.
- 162 Lu H., Cui W., Klaassen C. D. Nrf2 protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced oxidative injury and steatohepatitis // *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2011. Vol. 256, N 2. P. 122–135.
- 163 Luca S. V., Aprotosoai A. C., Miron A. The antigenotoxic potential of flavonoids // *Phytochemistry Reviews.* 2016. Vol. 15, N 4. P. 591–625.
- 164 Luca S.V. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020. Vol. 60, N 4. P. 626-659.
- 165 Mahmoud H. U. R. et al. Effects of rutin and quercetin on doxorubicin-induced renocardiototoxicity in male Wistar rats // *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* 2020. Vol. 8, N 4. P. 370–384.
- 166 Mahran R.I. et al. Bringing Curcumin to the Clinic in Cancer Prevention: a Review of Strategies to Enhance Bioavailability and Efficacy // *AAPS J.* 2017. Vol. 19, N 1. P. 54-81.
- 167 Mallebrera B. et al. Antioxidant capacity of trans-resveratrol dietary supplements alone or combined with the mycotoxin beauvericin // *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association.* 2017. Vol. 105. P.315–318.
- 168 Manach C. et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 409. P. 12-16.
- 169 Margina D. et al. Quercetin and epigallocatechin gallate effects on the cell membranes biophysical properties correlate with their antioxidant potential // *Gen. Physiol. Biophys.* 2012. Vol. 31, N 1. P. 47-55.

- 170 Martínez-Casales M., Hernanz R., Alonso M.J. Vascular and Macrophage Heme Oxygenase-1 in Hypertension: A Mini-Review // *Front Physiol.* 2021. Vol. 12. P. 643435.
- 171 Martin-Pelaez S. et al. Health effects of olive oil polyphenols: recent advances and possibilities for the use of health claims // *Mol. Nutr. Food Res.* 2013. Vol. 57. P. 760–71.
- 172 Matacchione G. et al. Pleiotropic effects of polyphenols on glucose and lipid metabolism: Focus on clinical trials // *Ageing Res. Rev.* 2020. Vol. 61. P. 101074.
- 173 Matsumoto H. et al. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma // *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52, N 21. P. 6653-6659.
- 174 McNally S.J. et al. Optimization of the paired enzyme assay for heme oxygenase activity // *Anal. Biochem.* 2004. Vol. 332, N 2. P. 398-400.
- 175 Miltonprabu S. et al. Hepatoprotective effect of quercetin: From chemistry to medicine // *Food Chem. Toxicol.* 2017. Vol. 108, N Pt B. P. 365-374.
- 176 Nakahira K. et al. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity // *Biochem Pharmacol.* 2003. Vol. 66, N 6. P. 1091-105.
- 177 Nakahira K., Takahashi T., Shimizu H. et al. Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity // *Biochem Pharmacol.* 2003. Vol. 66, N 6. P. 1091-105.
- 178 Nioi P. et al. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation // *Mol. Cell Biol.* 2005. Vol. 25, N 4. P. 10895-906.
- 179 Noda S. et al. Gene expression of detoxifying enzymes in AhR and Nrf2 compound null mutant mouse // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003. Vol. 303, N 1. P. 105–111.
- 180 Ohta K. et al. Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis // *Biochem J.* 2007. Vol. 402, N 3. P. 559-66.

- 181 Panda A.K. et al. New insights into therapeutic activity and anticancer properties of curcumin. *J. Exp. Pharmacol.* 2017. Vol. 9. P. 1-45.
- 182 Park I.J. et al. Green tea catechin controls apoptosis in colon cancer cells by attenuation of H₂O₂-stimulated COX-2 expression via the AMPK signaling pathway at low-dose H₂O₂ // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009. Vol. 117. P. 538-44.
- 183 Patil S.L., Mallaiah S.H., Patil R.K. Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation // *J. Med. Phys.* 2013. Vol. 38, N 2. P. 87-92.
- 184 Peng X. et al. Curcumin attenuates on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice via modulation of the Nrf2/HO-1 and TGF- β 1/Smad3 pathway // *Molecules.* 2018. Vol. 23, N 1. P. 215.
- 185 Prasad S., Tyagi A. K., Aggarwal B. B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice // *Cancer Research and Treatment.* 2014. Vol. 46, N 1. P. 2–18.
- 186 Pullikotil P. et al. Epigallocatechin gallate induces expression of heme oxygenase-1 in endothelial cells via p38 MAPK and Nrf-2 that suppresses proinflammatory actions of TNF- α // *J. Nutr. Biochem.* 2012. Vol. 23, N 9. P. 1134-45.
- 187 Purdom-Dickinson S.E., Lin Y. et al. Induction of antioxidant and detoxification response by oxidants in cardiomyocytes: evidence from gene expression profiling and activation of Nrf2 transcription factor. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2007. Vol. 42, N 1. P. 159-76.
- 188 Purdom-Dickinson S.E., Sheveleva E.V. et al. Translational control of Nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants // *Mol. Pharmacol.* 2007. Vol. 72, N 4. P. 1074-81.
- 189 Pyrzynska K. Hesperidin: a review on extraction methods, stability and biological activities. *Nutrients.* 2022. Vol. 14, N 12. P. 2387.
- 190 Rada P. et al. Structural and functional characterization of nrf2 degradation by the glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP Axis // *Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 32, N 17. P. 3486–3499.

- 191 Randle L.E. et al. Investigation of the effect of a panel of model hepatotoxins on the Nrf2-Keap1 defence response pathway in CD-1 mice // *Toxicology*. 2008. Vol. 243. P. 249-260
- 192 Reddy M.K. et al. Protective effect of rutin in comparison to silymarin against induced hepatotoxicity in rats // *Veterinary World*. 2017. Vol. 10, N 1. P. 74–80.
- 193 Ren H. et al. Hesperetin suppresses inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 Cells via the inhibition of NF- κ B and activation of Nrf2/HO-1 pathways // *Inflammation*. 2016. Vol. 39, N 3. P. 964-73.
- 194 Riemschneider S., Hoffmann M., Slanina U. et al. Indol-3-carbinol and quercetin ameliorate chronic DSS-induced colitis in C57BL/6 mice by AhR-mediated anti-inflammatory mechanisms // *Int J Environ Res Public Health*. 2021. Vol. 18, N 5. P. 2262.
- 195 Rivera-Espinoza Y., Muriel P. Pharmacological actions of curcumin in liver diseases or damage // *Liver Int*. 2009. Vol. 29, N 10. P. 1457-1466.
- 196 Roohbakhsh A. et al. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases // *Life Sci*. 2015. Vol. 124. P. 64-74
- 197 Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control // *Redox Biol*. 2021. Vol. 41. P. 101950.
- 198 Ross D., Siegel D. Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch // *Front Physiol*. 2017. Vol. 8. P. 595.
- 199 Rubiolo J.A., Mithieux G., Vega F.V. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes // *Eur. J. Pharmacol*. 2008. Vol. 591, N1-3. P. 66-72.
- 200 Ryter S.W., Choi A.M. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation // *Transl. Res*. 2016 Vol. 167. P. 7–34.

- 201 Saeidnia S., Abdollahi M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013. Vol. 273, N 3. P. 442-55.
- 202 Saeidnia S., Abdollahi M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century // *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013. Vol. 271. P. 49–63.
- 203 Saha S., Buttari B., Panieri E. et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation // *Molecules.* 2020. Vol. 25, N. 22. P. 5474.
- 204 Sahin K. et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats // *Life Sci.* 2010. Vol. 87, N 7-8. P. 240-5.
- 205 Saw C.L. et al. Pharmacodynamics of dietary phytochemical indoles I3C and DIM: Induction of Nrf2-mediated phase II drug metabolizing and antioxidant genes and synergism with isothiocyanates // *Biopharm Drug Dispos.* 2011. Vol. 32, N 5. P. 289-300.
- 206 Scapagnini G. et al. Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain // *Brain Res.* 2002. Vol. 954. P. 51–59.
- 207 Schaffer M., Schaffer P.M., Bar-Sela G. An update on Curcuma as a functional food in the control of cancer and inflammation // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2015. Vol. 18, N 6. P. 605-611
- 208 Scott M.B., Styring A.K., McCullagh J.S.O. Polyphenols: bioavailability, microbiome interactions and cellular effects on health in humans and animals // *Pathogens.* 2022. Vol. 11, N 7. P. 770.
- 209 Shen C. et al. Resveratrol pretreatment attenuates injury and promotes proliferation of neural stem cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation by upregulating the expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 in vitro // *Mol. Med. Rep.* 2016. Vol. 14, N 4. P. 3646-3654.
- 210 Shen N. et al. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity // *Food Chem.* 2022. Vol. 383. P. 132531.

- 211 Sherif I.O. The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway // *Int. Immunopharmacol.* 2018. Vol. 61. P. 29-36.
- 212 Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism // *Tohoku J. Exp. Med.* 2003. Vol. 200. P. 167–186.
- 213 Sihvola V., Levonen A. L. Keap1 as the redox sensor of the antioxidant response // *Arch. Biochem. Biophys.* 2017. Vol. 617. P. 94–100
- 214 Singh B. et al. Resveratrol inhibits estrogen-induced breast carcinogenesis through induction of NRF2-mediated protective pathways // *Carcinogenesis.* 2014. Vol. 35, N 8. P. 1872-80.
- 215 Singla R.K. et al. Natural polyphenols: chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures // *J. AOAC Int.* 2019. Vol. 102, N 5. P. 1397-1400.
- 216 Spagnuolo C. et al. Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012. Vol. 1259. P. 95–103.
- 217 Steinmann J., Buer J., Pietschmann T., Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea // *Br. J. Pharmacol.* 2013. Vol. 168, N 5. P. 1059-1073.
- 218 Stohs S. J., Hassoun E. A. Dioxin-activated AhR: toxic responses and the induction of oxidative stress. In: Pohjanvirta R., editor. *The AH Receptor in Biology and Toxicology*. 1st. John Wiley and Sons; 2012. pp. 229–244.
- 219 Strom J. et al. Nrf2 protects mitochondrial decay by oxidative stress // *FASEB J.* 2016. Vol. 30. P. 66–80.
- 220 Tang Y. et al. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of querceting glycosides // *Food Research International.* 2016. Vol. 89. P. 716–723.

- 221 Tang Y. et al. Quercetin suppressed CYP2E1-dependent ethanol hepatotoxicity via depleting heme pool and releasing CO // *Phytomedicine*. 2013. Vol. 20, N 8-9. P. 699-704.
- 222 Tanigawa S., Fujii M., Hou D.X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 42, N 11. P. 1690-1703.
- 223 Tayyem R. F. et al. Curcumin content of turmeric and curry powders // *Nutrition and Cancer*. 2006. Vol. 55, N 2. P. 126–131.
- 224 Tejada S. et al. Potential anti-inflammatory effects of hesperidin from the genus citrus. *Curr Med Chem*. 2018. Vol. 25, N 37. P. 4929-4945.
- 225 Tenhunen R., Marver H.S., Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1968. Vol. 6. P. 748–755.
- 226 Tirkey N. et al. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney // *BMC Pharmacol*. 2005. Vol. 5. P.2.
- 227 Tkachev V.O., Menshchikova E.B., Zenkov N.K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system // *Biochemistry (Mosc)*. 2011. Vol. 76, N 4. P. 407-22.
- 228 Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation // *Life Sci*. 2022. Vol. 291, article number 120111.
- 229 Ungvari Z. et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010. Vol. 299, N 1. P. H18-H24.
- 230 Valerio L.G.Jr. et al. Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin // *Toxicol. Lett.* 2001. Vol. 119, N 1. P. 49-57.
- 231 Vauzour D. et al. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action // *Nutrients*. 2010. Vol. 2. P. 1106–1131.

- 232 Verstraeten S.V., Fraga C.G., Oteiza P.I. Flavonoids-membrane interactions: consequences for biological actions // *Plant Phenolics and Human Health. Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology* / Ed. C.G. Fraga. USA : Wiley, 2010. P. 107-136.
- 233 Vincenzi S. et al. Comparative study of the resveratrol content of twenty-one Italian red grape varieties // *South African Journal for Enology and Viticulture*. 2013. Vol. 341, N 1. P. 30–34.
- 234 Vladimir-Knežević S. et al. Hepatoprotective effects of *Micromeria croatica* ethanolic extract against CCl₄-induced liver injury in mice // *BMC Complement Altern Med*. 2015, Vol. 15. P. 233.
- 235 Wang B. et al. Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress, and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity // *Nutr. Res*. 2013. Vol. 33, N 11. P. 971-81.
- 236 Wang M.L. et al. Antiangiogenic activity of indole-3-carbinol in endothelial cells stimulated with activated macrophages // *Food Chem*. 2012. Vol. 134, N 2. P. 811 - 820.
- 237 Wang H., Liu K., Geng M. et al. RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2 // *Cancer Res*. 2013. Vol. 73, N 10. P. 3097-108.
- 238 Wang W. et al. The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review // *Trends in Food Science and Technology*/ 2016. Vol. 56. P. 21–38.
- 239 Wang Z. et al. Resveratrol induces gastric cancer cell apoptosis via reactive oxygen species, but independent of sirtuin1 // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2012. Vol. 39, N 3. P. 227-32.
- 240 Wen T. et al. Dynamic changes of heme oxygenase-1 and carbon monoxide production in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats // *Toxicology*. 2006. Vol. 228, N 1. P. 51-7.
- 241 Williamson G., Kay C.D., Crozier A. The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective //

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2018. Vol. 17. P. 1054-1112.
- 242 Wu C.C. et al. Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways // *Life Sci.* 2006. Vol. 78, N 25. P. 2889-97.
- 243 Wu J. et al. The non-canonical effects of heme oxygenase-1, a classical fighter against oxidative stress // *Redox Biol.* 2021. Vol. 47. P. 102170.
- 244 Wu T. et al. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via the Nrf2/HO-1 pathway // *Cell Physiol Biochem.* 2017/ Vol. 41, N 6. P. 2242-2254.
- 245 Wu T.Y. et al. Epigenetic modifications of Nrf2 by 3,3'-diindolylmethane in vitro in TRAMP C1 cell line and in vivo TRAMP prostate tumors // *AAPS J.* 2013. Vol. 15, N 3. P. 864-74.
- 246 Wu T.Y. In vivo pharmacodynamics of indole-3-carbinol in the inhibition of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: involvement of Nrf2 and cell cycle/apoptosis signaling pathways // *Mol. Carcinog.* 2012. Vol. 51, N 10. P. 761-70.
- 247 Xiao J.B., Hogger P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives // *Curr. Med. Chem.* 2015. Vol. 22. P. 23–38.
- 248 Xiao S. et al. Anti-inflammatory effect of hesperidin enhances chondrogenesis of human mesenchymal stem cells for cartilage tissue repair // *J. Inflamm.* 2018. Vol. 15. P. 14.
- 249 Xie L.W. et al. Green tea derivative (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) confers protection against ionizing radiation-induced intestinal epithelial cell death both in vitro and in vivo // *Free Radic. Biol. Med.* 2020. Vol. 161. P. 175-186.
- 250 Xie S.Z. et al. The Protective Effects of *Zornia diphylla* (L.) Pers. Against Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Mice // *Front Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 764282.

- 251 Yachie A. Heme oxygenase-1 deficiency and oxidative stress: a review of 9 independent human cases and animal models // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 4. P. 1514.
- 252 Yahfoufi N. et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols // *Nutrients*. 2018. Vol. 10, N 11. P. 1618.
- 253 Yang J., Guo J., Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin // *LWT Food Sci Technol*. 2008. Vol. 41. P. 1060-1066
- 254 Yang S., Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply // *Mol Cell Biochem*. 2020. Vol. 467, N 1-2. P. 1-12.
- 255 Yang Q., Wang W. The nuclear translocation of heme oxygenase-1 in human disease // *Front Cell Dev Biol*. 2022. Vol. 10. P. 890186.
- 256 Yeager R. L. et al. Introducing the 'TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery' // *Toxicological Sciences*. 2009. Vol. 111, N 2. P. 238–246.
- 257 Yin X. et al. Mechanism of isomers and analogues of resveratrol dimers selectively quenching singlet oxygen by UHPLC-ESI-MS2 // *Food Chemistry*. 2017. Vol. 237. P. 1101–1111.
- 258 Zamora-Ros R. et al. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a spanish population: European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)-Spain cohort // *British Journal of Nutrition*. 2008. Vol. 100, N 1. P. 188–196.
- 259 Zamora-Ros R. et al. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study // *Eur J Nutr*. 2016. Vol. 55, N 4. P. 1359-75.
- 260 Zhang D.D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway // *Drug Metab Rev*. 2006. Vol. 38, N 4. P. 769-89.
- 261 Zhang J. et al. Nrf2 Neh5 domain is differentially utilized in the transactivation of cytoprotective genes // *Biochem J*. 2007. Vol. 404, N 3. P. 459-66.
- 262 Zhang J.Q. et al. Therapeutic detoxification of quercetin against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice and its mechanism // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2014. Vol. 15, N 12. P. 1039-47.

- 263 Zhang J.Y. et al. Combinational treatment of curcumin and quercetin against gastric cancer MGC-803 cells in vitro // *Molecules*. 2015. Vol. 20, N 6. P. 11 524-11 534.
- 264 Zhang K., Chen D., Ma K. Wu X., Hao H., Jiang S. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) as a therapeutic and diagnostic target in cancer // *J Med Chem*. 2018. Vol. 61, N 16. P. 6983-7003.
- 265 Zhang S. et al. Natural polyphenols in metabolic syndrome: protective mechanisms and clinical applications // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. Vol. 22, N 11. P. 6110.
- 266 Zhang Z.M. et al. Modulation of NRF2 and UGT1A expression by epigallocatechin-3-gallate in colon cancer cells and BALB/c mice // *Chin Med J (Engl)*. 2009. Vol. 122, N 14. P. 1660-5.
- 267 Zhao X. et al. Quercetin as a protective agent for liver diseases: A comprehensive descriptive review of the molecular mechanism // *Phytother Res*. 2021. Vol. 35, N 9. P. 4727-4747.
- 268 Zhong Y. et al. Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages // *Food Chem*. 2012. Vol. 134, N 2. P. 742-8.
- 269 Zhou M. et al. Transcriptomic and metabonomic profiling reveal synergistic effects of quercetin and resveratrol supplementation in high fat diet fed mice // *J. Proteome Res*. 2012. Vol. 11, N 10. P. 4961-71.
- 270 Zhou Y. et al. Recent Advances of Natural Polyphenols Activators for Keap1-Nrf2 Signaling Pathway // *Chem. Biodivers*. 2019. Vol. 16, N 11. P. e1900400.
- 271 Zhu C. et al. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells // *Biomed. Pharmacother*. 2017. Vol. 88. P. 124–133.
- 272 Zhu J. et al. An overview of chemical inhibitors of the Nrf2-ARE signaling pathway and their potential applications in cancer therapy // *Free Radical Biol. Med*. 2016. Vol. 99. P. 544–556