

БАЛАКИНА АНАСТАСИЯ СТАНИСЛАВОВНА

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

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, г. Москва.

Научный руководитель:	Тутельян Виктор Александрович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», заведующий лабораторией энзимологии питания
Официальные оппоненты:	Перцов Сергей Сергеевич член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор медицинских наук, директор ФГБНУ «НИИНФ им. П.К.Анохина» Муронец Владимир Израилевич доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ
Ведущая организация:	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится «___»_____2023 г. в _____ на заседании диссертационного совета 24.1.241.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи и на сайте www.ion.ru

Автореферат разослан «___»_____2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Шумакова А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, не-флавоноиды 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 темы № 147 «Изучение молекулярных механизмов действия минорных биологически активных веществ пищи при их отдельном и сочетанном поступлении в организм».

Задачи исследования

1. В экспериментах *in vivo* у крыс изучить влияние индивидуального и сочетанного 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 сочетанного действия рутина, 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 CCl_4 , изучить *in vivo* влияние индивидуального и сочетанного действия БАВ пищи - антиоксидантов (рутина, гесперидина, кверцетина, куркумина) 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 рутина, 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 сочетанное действие рутина и гесперидина приводит к двукратному аддитивному эффекту на экспрессию белка ГО-1.

Установлено, что совместное действие кверцетина и ресвератрола умеренно активизирует 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 значимо 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 рецептов 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 опубликовано 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 источника, из которых 30 на русском и 242 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе использовали 208 крыс-самцов Вистар, полученных из питомника «Столбовая» с исходной массой тела 176 – 235 г. В каждом эксперименте (продолжительность 14 дней) крысы были разделены на однородные по массе тела группы – контрольную и опытные, согласно плану исследования (Табл. 1 и 2). Крыс содержали в клетках по 2-3 особи в каждой в условиях искусственного освещения (12-ти часовой цикл день/ночь) при температуре 22-25⁰С и относительной влажности воздуха 60-80% на подстилке из древесных стружек. Животные получали питьевую воду без ограничений и полусинтетический рацион на основе AIN93M в режиме свободного доступа из расчета 15 г сухого корма на крысу. Крыс депривировали голодом за 16 часов до окончания эксперимента. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Исследования на животных выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в Национальном стандарте РФ ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ Р 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

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 ПЕСУРС» 4010000768).

Дизайн экспериментов. Эффекты отдельного и сочетанного поступления БАВ в организм изучали у интактных животных, включая в состав рациона крыс отдельно и в комбинации следующие соединения: **рутин (Р)** и **гесперидин (Гес)** в количестве, обеспечивающем дозу 400 мг/кг массы тела (м.т.); **кверцетин (Кв)** и **ресвератрол (Рес)** в количестве, обеспечивающем дозу 100 мг/кг м.т.; **куркумин (Кур)** и **кверцетин (Кв)** в количестве, обеспечивающем дозу 200 мг/кг м.т.; **индол-3-карбинол (ИЗК)** и **эпигаллокатехингаллат (ЭГКГ)** в количестве, обеспечивающем дозу 50 мг/кг м.т. и 200 мг/кг м.т., соответственно. Сводный дизайн экспериментов на интактных животных представлен в Табл. 1.

Табл. 1 - Дизайн экспериментов на интактных крысах

Группа	Кол-во крыс	Рацион	БАВ	Доза
Эксперимент 1				
Контроль	8	Полусинтетический рацион	-	-
1-я опытная	8		Рутин	400 мг/кг м.т.
2-я опытная	8		Гесперидин	400 мг/кг м.т.
3-я опытная	8		Рутин + Гесперидин	400 + 400 мг/кг м.т.
Эксперимент 2				
Контроль	8	Полусинтетический рацион	-	-
1-я опытная	8		Кверцетин	100 мг/кг м.т.
2-я опытная	8		Ресвератрол	100 мг/кг м.т.
3-я опытная	8		Кверцетин + Ресвератрол	100 + 100 мг/кг м.т.
Эксперимент 3				
Контроль	8	Полусинтетический рацион	-	-
1-я опытная	8		Куркумин	200 мг/кг м.т.
2-я опытная	8		Кверцетин	200 мг/кг м.т.
3-я опытная	8		Куркумин + Кверцетин	200 + 200 мг/кг м.т.
Эксперимент 4				
Контроль	8	Полусинтетический рацион	-	-
1-я опытная	8		Индол-3-карбинол	50 мг/кг м.т.
2-я опытная	8		Эпигаллокатехингаллат	200 мг/кг м.т.
3-я опытная	8		Индол-3-карбинол + Эпигаллокатехингаллат	50 + 200 мг/кг м.т.

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

Для развития окислительного стресса за 24 ч до окончания эксперимента животным опытных групп однократно внутрибрюшинно (в/б) 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. Сводный дизайн экспериментов на модели окислительного стресса представлен в Табл. 2.

Табл. 2 - Дизайн экспериментов на модели окислительного стресса у крыс

Группа	Кол-во крыс	Рацион	БАВ	Доза	В/б введение за 24 ч до конца эксперимента
Эксперимент 5					
Контроль	8	Полусинтетический рацион	-	-	оливковое масло (ОМ)
1-я опытная	8		-	-	CCl ₄ 0,5 мл/кг м.т. в ОМ
2-я опытная	8		рутин	400 мг/кг м.т.	CCl ₄ 0,5 мл/кг м.т. в ОМ
3-я опытная	8		гесперидин	400 мг/кг м.т.	CCl ₄ 0,5 мл/кг м.т. в ОМ
4-я опытная	8		рутин + гесперидин	400 + 400 мг/кг м.т.	CCl ₄ 0,5 мл/кг м.т. в ОМ
Эксперимент 6					
Контроль	8	Полусинтетический рацион	-	-	ОМ
1-я опытная	8		-	-	CCl ₄ 1,0 мл/кг м.т. в ОМ
2-я опытная	8		куркумин	200 мг/кг м.т.	CCl ₄ 1,0 мл/кг м.т. в ОМ
3-я опытная	8		кверцетин	200 мг/кг м.т.	CCl ₄ 1,0 мл/кг м.т. в ОМ
4-я опытная	8		куркумин + кверцетин	200 + 200 мг/кг м.т.	CCl ₄ 1,0 мл/кг м.т. в ОМ

Подготовка материала для исследований (выделение внутриклеточных фракций печени). После декапитации у животных отбирали печень в условиях, не превышающих 4 °С, и оценивали её абсолютную и относительную массу. Для оценки активности ферментов осуществляли выделение цитозольной и микросомальной фракций печени с использованием метода [Lake B.G., 1987] и ядерную и цитоплазматическую фракции для оценки экспрессии белков печени методом Вестерн-блоттинг.

Методы биохимических исследований. В микросомальной фракции печени определение активности ГО-1 проводили при +37°С по методу [McNally S.J., 2004]. Активность ХР в цитозольной фракции печени определяли при +25°С по методу [Benson A.M., 1980].

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). Определение содержания мРНК β-актина (*Actb*), гемоксигеназы-1 (*Hmox1*), NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы (*NQO1*) и транскрипционного фактора *Nrf2* (*Nrf2*) проводили на приборе CFX 96 (Bio-Rad, США). Реакцию ПЦР для всех изучаемых генов проводили по следующей схеме: активация iTaq ДНК-полимеразы при 95°С в течение 3 мин; 40 циклов, каждый из которых состоял из денатурации при 95°С в течение 15 с для *Actb* и *Nrf2*; 20 с - *NQO1* и 5 с - *Hmox1*, отжига праймеров (58°С, 15 с для *Actb*; 58°С, 20 с - *Nrf2*; 60°С, 30 с - *NQO1*, *Hmox1*) и синтеза продукта при 72°С в течение 45 с – для *Actb*, 27 с - *Nrf2*; 30 с - *NQO1* и 10 с - *Hmox1*; после окончания циклов проводили контроль специфичности праймеров (последовательность праймеров представлена в Табл. 3) с помощью анализа кривой плавления (melt curve) в диапазоне 50-95°С (шаг 0,5°С по 10 с каждый).

Табл. 3 - 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 CTCAATCGGCTTGAATGTTTGTGTC

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).

Вестерн-блоттинг. В цитоплазматической фракции определяли содержание белков ГО-1, XP, Nrf2, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДГ), актина; в ядерной – уровень белка Nrf2 и SP-1. Образцы подвергали электрофоретическому разделению в 10% полиакриламидном геле при 200 В в течение 50 мин и переносили на поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану при 20В в течение 30 мин, которую оставляли на ночь при 4°C в растворе соответствующих антител (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). Интенсивность хемилюминесценции оценивали на системе гель-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.

Статистический анализ данных выполняли с использованием компьютерной программы IBM SPSS Statistic 20 (Statistical Package for Social Sciences, США) согласно данным описательной статистики, критерию ANOVA, критерию Крускала-Уоллиса, тесту Стьюдента. В связи с тем, что групповые выборки данных не подчинялись закону нормального распределения, для статистического анализа применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия между группами животных признавали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

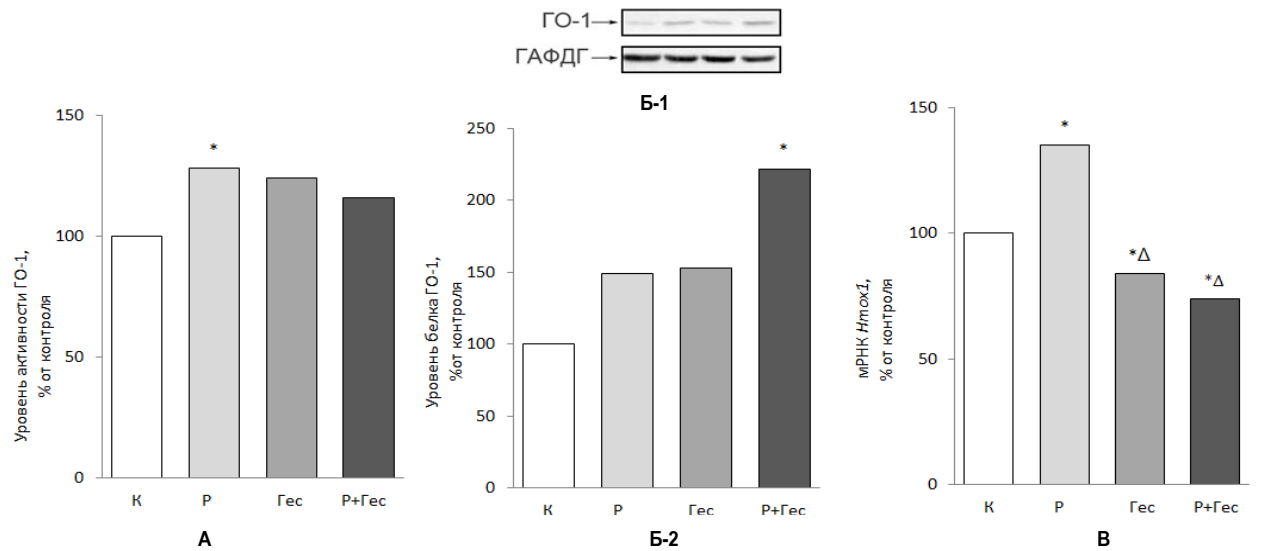
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение влияния минорных биологически активных веществ пищи – антиоксидантов на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и комбинированном поступлении в организм

1.1. Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и комбинированном поступлении в организм

На Рис. 1 показано, что включение в рацион здоровых интактных крыс Р и, в меньшей степени, Гес вызывает возрастание активности (на 28% ($p < 0,05$) и на 24% ($p > 0,05$), соответственно) и количества белка ГО-1 (на 49% и 53% ($p > 0,05$)). Важно отметить, что при совместном включении в рацион Р и Гес наблюдается аддитивность их действия на экспрессию белка ГО-1 (более чем в 2 раза ($p < 0,05$) Рис.1Б), но не на активность фермента. Наряду с этим только Р повышает экспрессию гена *Hmox1* на 35% ($p < 0,05$) (Рис. 1В). Включение в рацион Р также увеличивает активность XP на 61% ($p < 0,05$) (Рис. 2А) и уровень экспрессии ее белка на 57% ($p > 0,05$) (Рис. 2Б). При этом получены данные 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 это увеличение наиболее выражено и достоверно отличается от контроля на 46%. Несмотря на умеренное снижение экспрессии гена *Nrf2* при включении в рацион Р или Гес на 27% и 20%, соответственно, их комбинированное действие приводит к увеличению до контрольного уровня мРНК *Nrf2*, что достоверно при сравнении с уровнем у крыс, получавших Р или Гес по отдельности.



Примечание (здесь и на Рис. 2, 3) – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой

Рис. 1 - 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

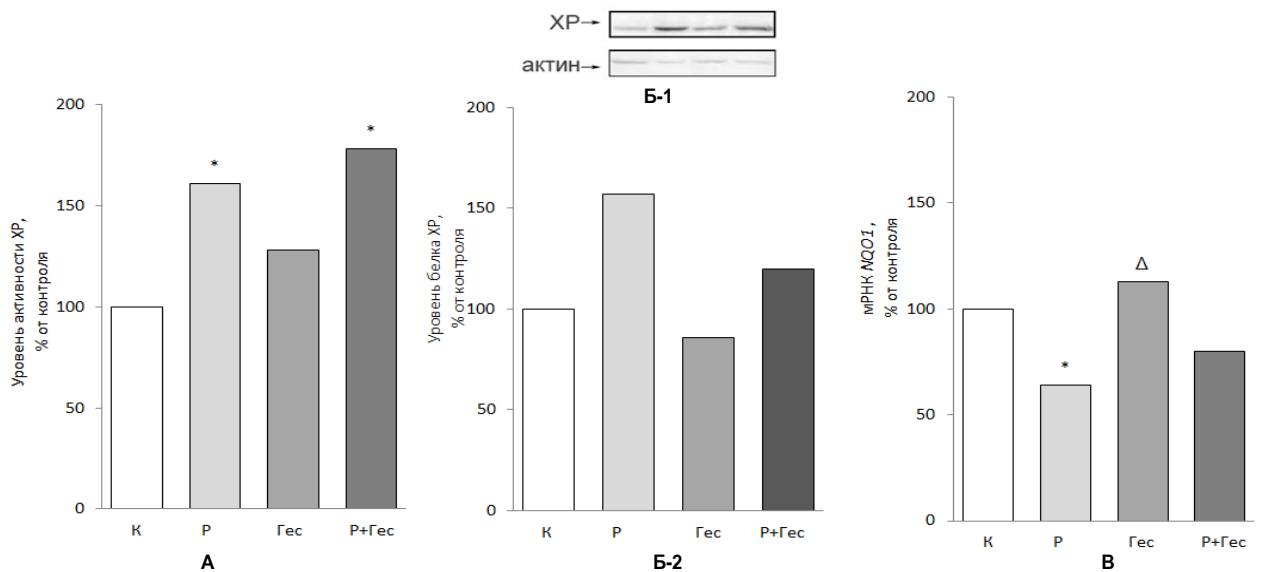


Рис. 2 - Активность фермента XR (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка XR (Б-1) и относительное содержание белка XR (Б-2) и уровень мРНК *NQO1* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии рутина и гесперидина

Способность Р и его агликона Кв 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 дозе 40 и 400 мг/кг м.т. [Кравченко Л.В. и соавт., 2015]. Длительное введение крысам Кв 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 Кв связано непосредственно с их способностью индуцировать активность ГО-1 [Purdom-Dickinson S.E. et al., 2007; Lui S. et al., 2012; Covas G. et al., 2013; Liu C. 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. [2010]. Способность Кв индуцировать активность фермента, экспрессию белка ХР и мРНК *NQO1* также обнаружена *in vitro* на культурах клеток MCF-7 и HepG2 [Valerio L.G. et al., 2001; Tanigawa S. et al., 2007]. В этих же экспериментах *in vitro* получены доказательства связи индуцированной Кв активации ХР с усилением 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 результаты показали, что совместное действие Р и Гес приводит к небольшому уменьшению индивидуальных эффектов Р и Гес на активность ГО-1 и экспрессию гена *Htoх1*. 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.

1.2. Изучение влияния кверцетина и ресвератрола на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм

Только совместное включение Кв и Рес в рацион здоровых интактных крыс приводило к достоверному повышению активности ГО-1 на 18% и экспрессии белка ГО-1 на 51% ($p > 0,05$) в печени животных, при отсутствии изменений экспрессии гена фермента. Аналогично, при отсутствии достоверных изменений в группах с добавлением в рацион Кв или Рес по отдельности, только их совместное действие (3-я опытная группа) вызывало возрастание (недостоверное) активности ХР на 38% и резкое возрастание экспрессии белка ХР в 4 раза ($p < 0,05$) относительно контроля, а также достоверное усиление на 73% 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 (на 38%, 52% и 38%), как показано на Рис. 3А, но усиливает его экспрессию в цитозольной фракции (Рис. 3Б) во всех опытных группах, что статистически значимо только при включении Рес (на 64%). При этом Рес, как и Рес вместе с Кв,

индуцируют небольшое возрастание экспрессии гена *Nrf2* (на 26% и 20%, соответственно) (Рис. 3В).

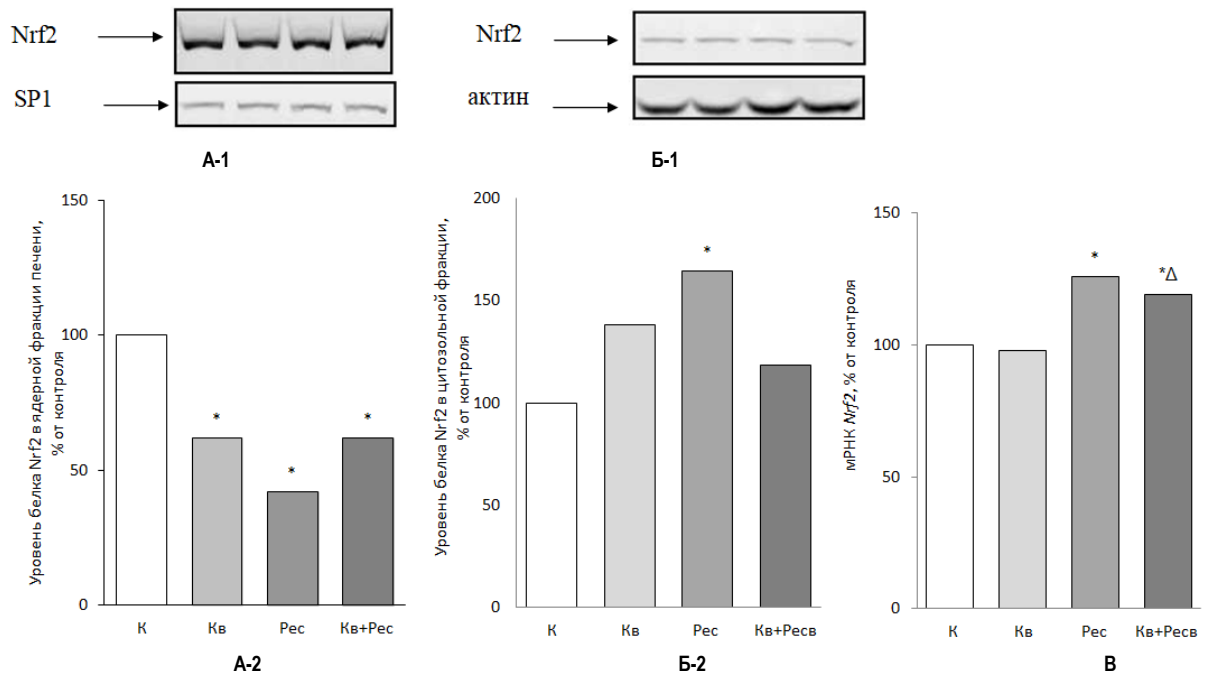


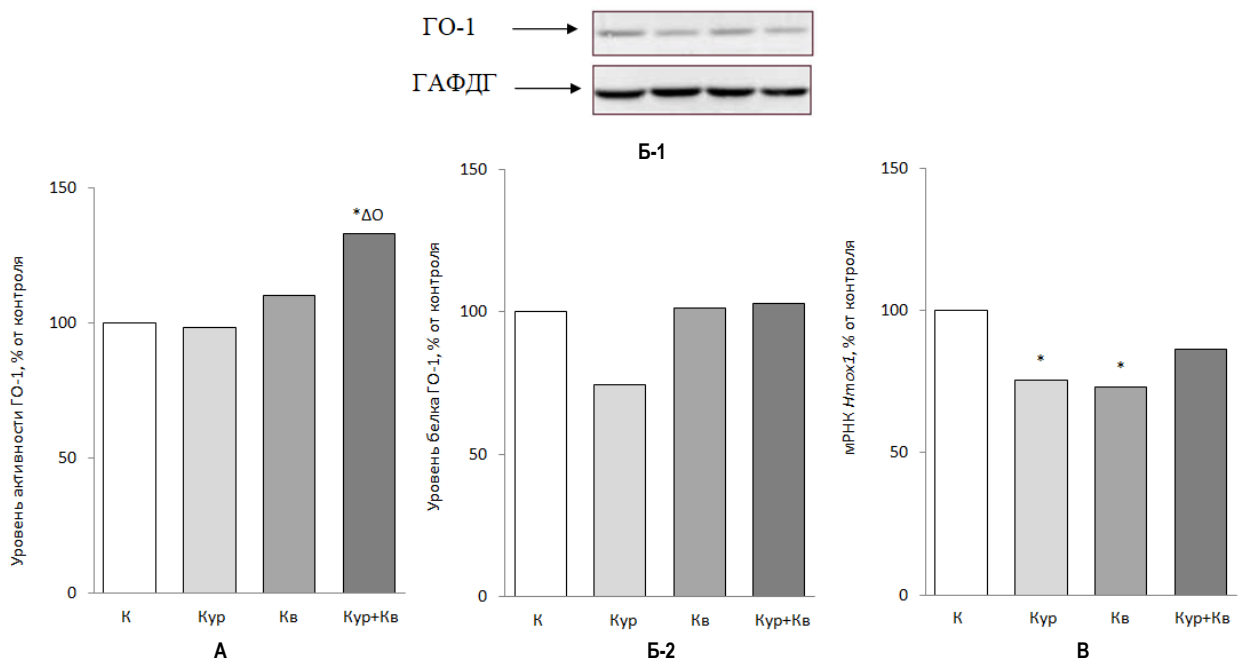
Рис. 3 - Репрезентативный вестерн-блот анализ белка Nrf2 в ядерной (А-1) и цитозольной (Б-1) фракциях печени и относительное содержание белка Nrf2 в ядерной (А-2) и цитозольной (Б-2) фракциях печени и уровень мРНК *Nrf2* (В) в печени крыс при раздельном и совместном действии кверцетина и ресвератрола

Литературные данные, полученные в основном в условиях *in vitro*, свидетельствуют о способности Кв и Рес 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 усиливал экспрессию гена *Hmox1*. Воздействие Кв на клетки MCF-7 приводило к двукратному увеличению уровня белка ХР и активности фермента и увеличению экспрессии мРНК *NQO1* в три-четыре раза [Valerio L.G. et al., 2001]. Рес активировал экспрессию белка ГО-1 в клетках PC12 [Chen C.Y. et al., 2005] и стимулировал экспрессию белка ХР в человеческих эпителиальных клетках [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, при этом значительно возрастали уровни экспрессии белка Nrf2, ГО-1 и ХР [Shen C. et al., 2016].

Способность Кв и Рес индуцировать активность антиоксидантных ферментов *in vivo* установлена лишь в единичных исследованиях. Так, введение крысам Кв 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 *NQO1* [Singh B. et al., 2014].

1.3. Изучение влияния куркумина и кверцетина на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их раздельном и сочетанном поступлении в организм

Включение в рацион Кур или Кв по отдельности не оказывало влияния на активность ГО-1 и экспрессию ферментного белка, в то время как при их совместном действии отмечалась синергическая активация фермента на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, не связанная с изменениями экспрессии белка и гена фермента (Рис. 4). Согласно данным ПЦР уровень мРНК *Hmox1* в печени крыс при введении Кур или Кв в рацион был несколько ниже контрольного уровня (на 25% и 27% ($p < 0,05$), соответственно, Рис. 4В) и практически не отличался от него в группе, получавшей Кур вместе в Кв. Активность ХР и экспрессия белка ХР умеренно возрастали (на 32% и 43% ($p < 0,05$), соответственно) относительно контрольного уровня у крыс, получавших Кв, но не отличались от контроля в группе с Кур и Кв. Не обнаружено существенного влияния Кур и Кв как при раздельном, так и при совместном действии на экспрессию белка Nrf2 в ядерной и в цитозольной фракциях и на содержание мРНК *Nrf2* в печени крыс.



Примечание (здесь и на Рис. 5) – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-ой опытной группой, O - со 2-ой опытной группой

Рис. 4 - 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 куркумина и кверцетина

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 при индуцированном каррагенаном 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; 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*.

1.4. Изучение влияния индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и сочетанном поступлении в организм

Результаты, представленные на Рис. 5, свидетельствуют о том, 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 (возрастание на 29% относительно контроля). Однако не было выявлено корреляции изменения активности с изменением экспрессии белка ГО-1 и гена *Hmox1*. 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% (Рис. 5Б). Активность ХР в печени крыс при включении И-3-К отдельно и совместно с ЭГКГ, хотя и недостоверно, превышала контрольный уровень на 79% и на 47%, соответственно. Изменения уровня экспрессии гена *NQO1* имели однонаправленный характер с изменением активности ХР, но также были статистически незначимыми. Так, поступление И-3-К в организм животных приводило к усилению экспрессии мРНК *NQO1* в печени крыс на 56%; И-3-К вместе с ЭГКГ, - на 70%. Как показано на Рис. 5В, 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 то же 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%.

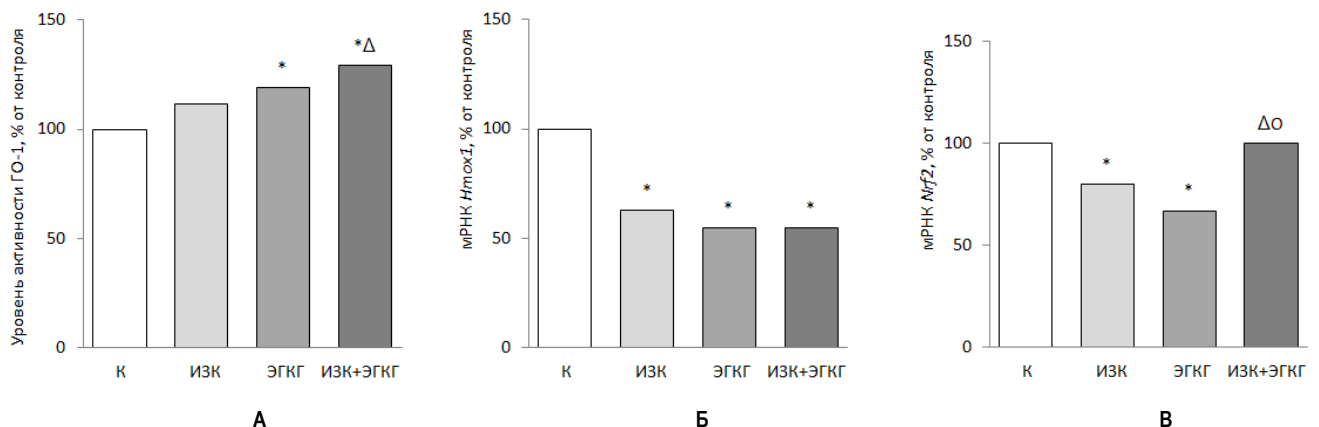


Рис. 5 - Активность фермента ГО-1 (А), уровень мРНК *Hmox1* (Б) и мРНК *Nrf2* (В) в печени крыс при отдельном и совместном действии индол-3-карбинола и эпигаллокатехингаллата

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 вдвое

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]. У здоровых интактных крыс включение ЭГКГ в рацион в дозе 105 мг/кг м.т. в течение 2 недель, не вызывало существенного изменения активности ГО-1 и экспрессии белка ГО-1 и Nrf2 [Кравченко Л.В. и соавт., 2011].

Полученные *in vitro* результаты свидетельствуют, что индуцирующее действие И-3-К и ЭГКГ на активность антиоксидантных ферментов опосредовано, главным образом, активирующим влиянием этих БАВ на транскрипционный фактор Nrf2. 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 TRAMP C1 И-3-К и его метаболит дииндолилметан (ДИМ) индуцировали экспрессию генов *NQO1* и *Nrf2*. В клетках линии HepG2-C8 И-3-К и ДИМ также индуцировали экспрессию мРНК *Nrf2* и генов *NQO1* и *Hmox1* [Saw C.L. et al., 2011].

2. Изучение влияния минорных биологически активных веществ пищи – антиоксидантов на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и комбинированном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

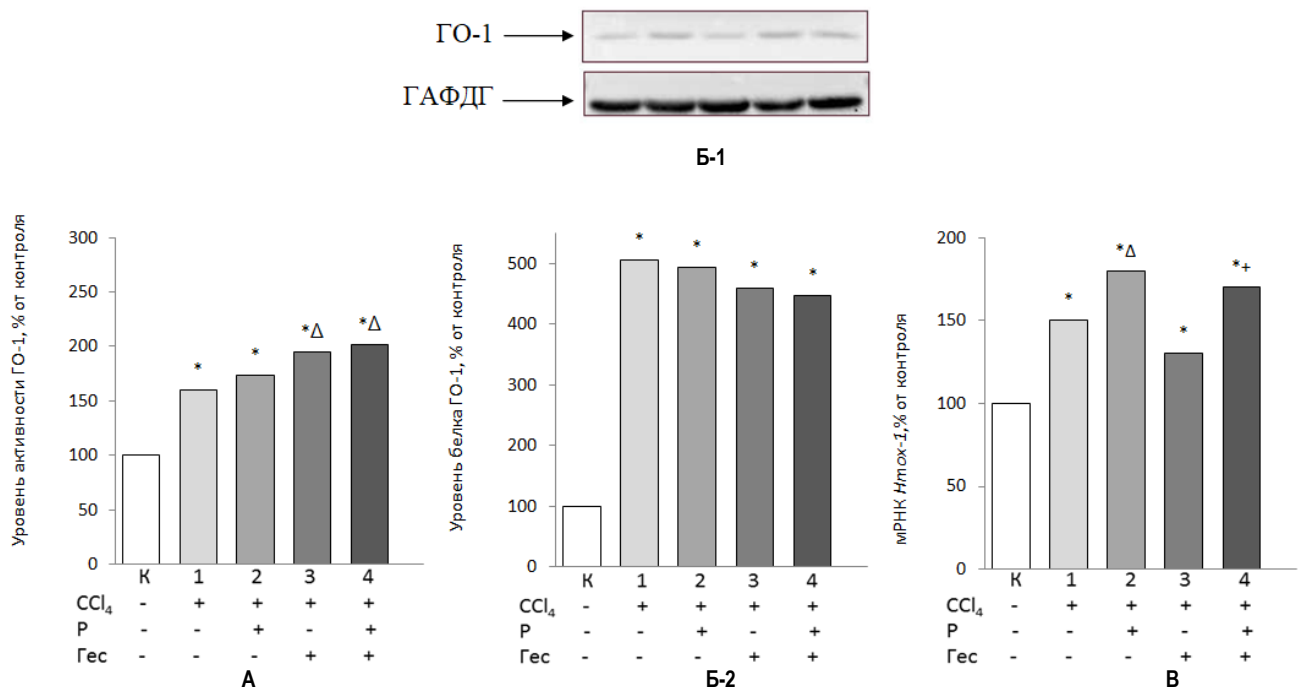
2.1. Изучение влияния рутина и гесперидина на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и комбинированном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Полученные результаты, представленные на Рис. 6 и 7, показали, что однократное внутрибрюшинное введение CCl_4 вызывает достоверное возрастание в печени крыс активности ГО-1 на 60% ($p < 0,05$), экспрессии ее белка в 5,3 раза и экспрессии гена *Hmox1* в 1,5 раза относительно контроля, а также достоверное снижение более чем в 2 раза экспрессии белка ХР и экспрессии гена *NQO1* на 40%.

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. Экспрессию 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]. Введение CCl_4 взрослым самцам крыс Sprague-Dawley вызывало выраженное снижение уровня экспрессии белка ХР в печени крыс [Wu T. et al, 2017], в исследовании на 5-недельных самцах Sprague-Dawley – приводило к снижению в 2 раза уровня мРНК *NQO1* в тканях печени по сравнению с контролем [Han C.Y. et al., 2019].

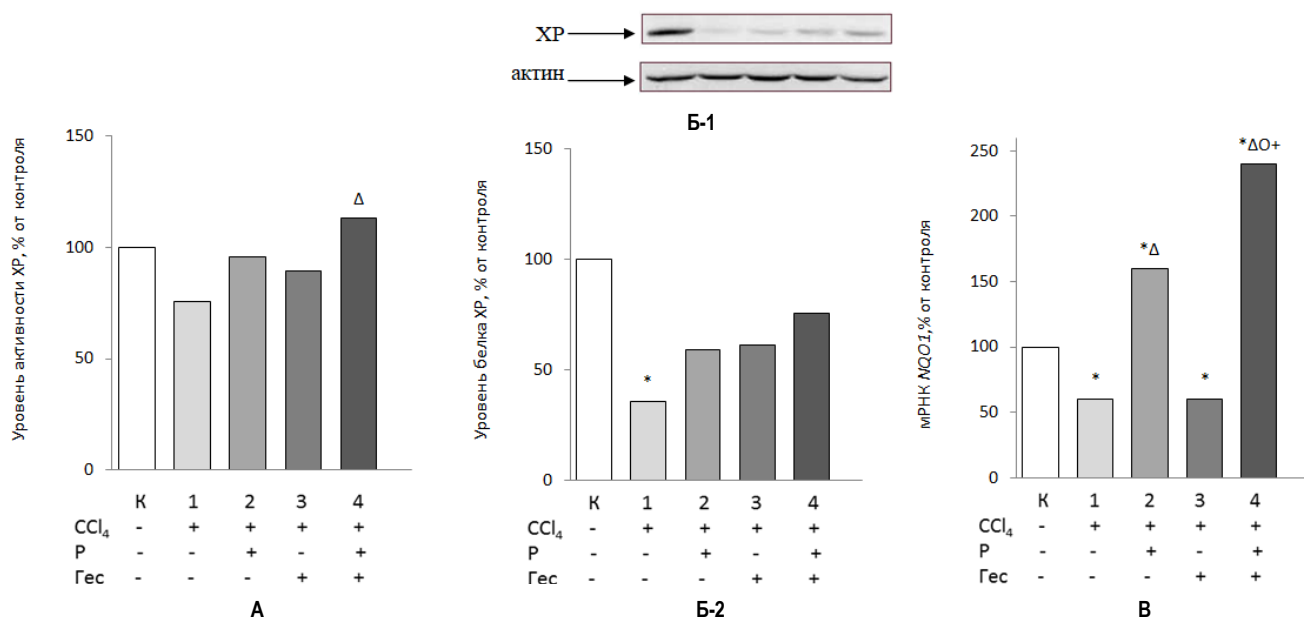
Как следует из данных Рис. 6А и 6В обогащение рациона крыс Р приводило к возрастанию активности ГО-1 на 8% ($p>0,05$) и экспрессии мРНК *Hmox1* на 20% ($p<0,05$), относительно уровня, индуцированного CCl_4 . В группе с Р уровень активности ХР, сниженный токсическим действием CCl_4 , восстанавливался до контрольного (Рис. 7А), а уровень экспрессии мРНК *NQO1* не только восстанавливался до контрольного, но и достоверно превышал его на 60% (Рис. 7В). 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].

По сравнению с введением CCl_4 контрольной группе (получавшей полусинтетический рацион), при обогащении рациона Гес (3-я опытная группа) наблюдали достоверное усиление вызванного CCl_4 действия на активность ГО-1 (на 21% ($p<0,05$)) при отсутствии изменений экспрессии ферментного белка и гена *Hmox1* (Рис. 6). Относительно 1-й группы не было обнаружено статистически значимого влияния Гес на сниженную введением CCl_4 активность ХР, экспрессию белка и гена фермента (Рис. 7). Имеются единичные работы, в которых сообщается о гепатопротекторном и нейропротекторном эффекте Гес при остром токсическом действии CCl_4 [Tirkey N. et al., 2005] и относительно мало данных о его взаимодействии с Nrf2-сигнальным путем.



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

Рис. 6 - 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 на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода



Примечание (здесь и на Рис. 8) – * - статистически значимое различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (К), Δ - с 1-й опытной группой, O - со 2-й опытной группой, + - с 3-й опытной группой

Рис. 7 - 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 раздельном и совместном действии рутина и гесперидина на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

При совместном включении в рацион крыс Р и Гес (4-я опытная группа) наблюдалось выраженное возрастание активности ГО-1 (Рис. 6А), достоверно превышавшее индуцированный CCl_4 уровень активности фермента на 26%, которое коррелировало с возрастанием экспрессии мРНК *Hmox1* (Рис. 6В). На Рис. 7 показано, что 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, статистически значимо превышающего контрольный в 1,5 раза. При совместном включении Р и Гес в рацион отмечался синергизм в действии на экспрессию гена *NQO1*.

Интересно отметить, что у крыс при CCl_4 -индуцированном окислительном стрессе 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 уровня 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 Nrf2 происходит не на транскрипционном уровне, а, как полагают, на уровне стабилизации белка Nrf2 [Dinkova-Kostova A.T. et al., 2017] и степени его транслокации в ядро. 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.

2.2. Изучение влияния куркумина и кверцетина на активность, экспрессию белков и генов Nrf2-регулируемых ферментов в печени крыс при их отдельном и сочетанном поступлении в организм на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

Полученные результаты, представленные на Рис. 8, показали, что однократное внутрибрюшинное введение CCl_4 приводило к достоверному возрастанию в печени крыс активности ГО-1 в 2 раза, экспрессии белка ГО-1 более, чем в 4 раза и экспрессии гена *Hmox1* в 1,5 раза и, хотя и статистически незначимому, снижению уровня экспрессии белка ХР и экспрессии гена *NQO1*, что совпадает с результатами предыдущего эксперимента (см. 2.1).

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 (Рис. 8А), экспрессии белка ГО-1 (Рис. 8Б) и гена *Hmox1* (Рис. 8В) относительно контрольного уровня, причем снижение действия CCl_4 было наиболее выраженным в группе при совместном включении Кур и Кв. Интересно отметить, что 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 ($p < 0,05$) (Рис. 8Г).

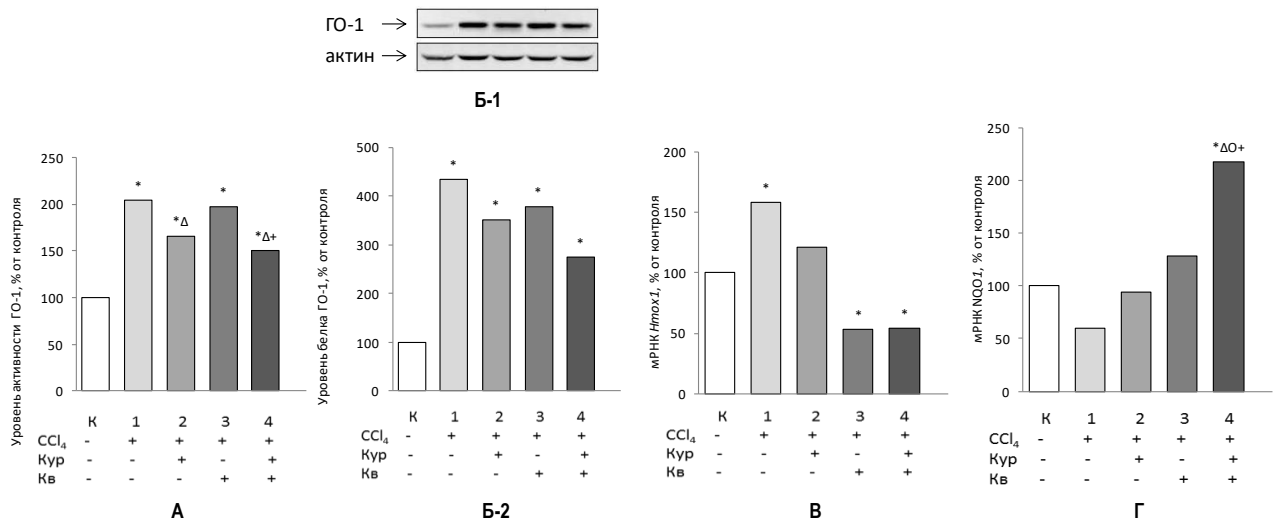


Рис. 8 - Активность фермента ГО-1 (А), репрезентативный вестерн-блот анализ белка ГО-1 (Б-1) и относительное содержание белка ГО-1 (Б-2), уровень мРНК *Hmox1* (В) и мРНК *NQO1* (Г) в печени крыс при отдельном и совместном действии куркумина и кверцетина на модели острого токсического действия четыреххлористого углерода

В ряде исследований на крысах [Farombi E. O. et al., 2007; Neeba G.H. et al., 2012; Liu Y. et al., 2015] было показано, что на модели 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].

Данные, полученные на интактных крысах, свидетельствуют о том, что только совместное включение Кур и Кв в рацион приводило к статистически значимому усилению активности ГО-1, что может объяснять снижение выраженности действия CCl_4 . Интересно отметить, что в аналогичных исследованиях на крысах введение CCl_4 в меньшей дозе - 0,5 мг/кг м.т. при 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 Кв [Балакина А.С., 2016].

Как показали наши исследования, у крыс на модели 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].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключом к сохранению здоровья человека является формирование оптимальной структуры питания, обеспечивающее полное соответствие между химическим составом рациона, физиологическими потребностями организма и поступлением БАВ. Отражением этого принципа является нутриом - совокупность необходимых алиментарных факторов, обеспечивающих поддержание адаптационного потенциала организма, системы антиоксидантной защиты, гомеостаза метаболизма и функций иммунной системы [Тутельян В.А. и соавт., 2020].

Несмотря на значимый объем данных о биологически активных свойствах и молекулярных механизмах действия отдельных полифенольных и индольных представителей БАВ, имеются лишь единичные сведения об их взаимодействии при совместном поступлении в организм [Krajka-Kuźniak V. et al., 2021], при этом сочетанные эффекты БАВ на *Nrf2*-регулируемые ферменты антиоксидантной защиты в условиях *in vivo* остаются малоизученными.

Фактор транскрипции *Nrf2* контролирует экспрессию генов, содержащих ARE (антиоксидант чувствительный элемент) и занимает центральное место в системе клеточной защиты от повреждений, вызванных электрофильными соединениями и оксидантами. *Nrf2* находится в клетках под постоянным контролем репрессорного белка *Keap1*, являющимся своеобразным молекулярным «сенсором» изменения внутриклеточного гомеостаза. Молекулярные структуры *Nrf2* и *Keap1* неразрывно связаны и действуют как составные части единой редокс-чувствительной сигнальной системы *Nrf2/Keap1/ARE*. Основным механизмом активации *Nrf2* заключается в окислительной модификации *Keap1* при действии оксидантов, приводящей к освобождению *Nrf2* и его транслокации в ядро, где при участии вспомогательных белков и коактиваторов, взаимодействуя с ARE, *Nrf2* активирует экспрессию генов-мишеней. Альтернативный путь активации транскрипционного

фактора Nrf2 состоит в фосфорилировании молекул Nrf2 и Keap1, контролируемом протеинкиназами различных семейств [Ляхович В.В. и соавт., 2006; Турпаев К.Т., 2013; Zhou Y. et al., 2019].

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 Кур и Кв, а так же 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: ГО-1 и ХР, как через сигнальный механизм Nrf2/Keap1/ARE так и на посттранскрипционном уровне. Обнаружено, что комбинированное действие БАВ пищи может в значительной степени модулировать их индивидуальные эффекты (Рис. 9).

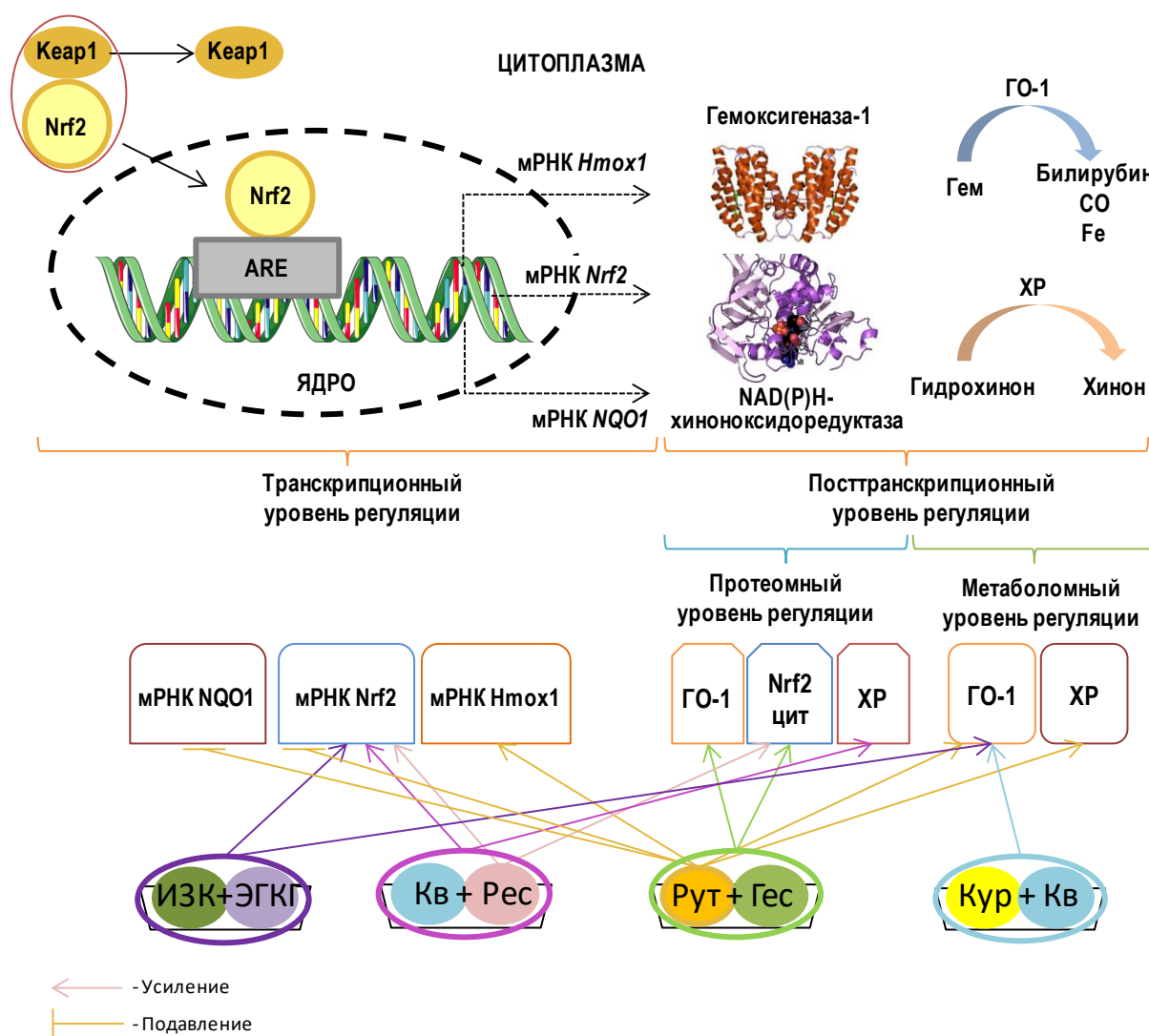


Рис. 9 - Схема сочетанного и индивидуального действия биологически активных веществ пищи – полифенолов различных классов и индол-3-карбинола на активность Nrf2-регулируемых ферментов на трех уровнях регуляции: транскрипционном, протеомном, метаболическом

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-хинооксидоредуктазы 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-хинооксидоредуктазы (на 61%) с одновременным достоверным снижением экспрессии генов *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 белков и генов 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 снижение 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* (на 20% и 33%, соответственно). В то же 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 характеризуются 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 гесперидина 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Аксенов И.В., **Балакина А.С.**, Гусева Г.В., Трусов Н.В. Изучение влияния рутина на защитный потенциал крыс // Вопросы питания. – 2015. – Т. 84, № 3. – С. 22-30.

2. **Балакина А.С.**, Трусов Н.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Влияние рутина и гесперицина на экспрессию гена Nrf2 и активность гемоксигеназы-1 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы при их раздельном и совместном действии // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, №3. – С. 18-26.

3. **Балакина А.С.**, Трусов Н.В., Аксенов И.В., Гусева Г.В., Кравченко Л.В., Тутельян В.А. Влияние рутина и гесперицина 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.

4. **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 раздельном и совместном действии // Вопросы питания. – 2017. – Т.86, №2 – С. 14-22.

в материалах научных конференций

5. **Балакина А.С.** Влияние рутина и гесперицина на сигнальную систему Nrf2/ARE крыс при остром токсическом действии четыреххлористого углерода // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, № S2. - С. 22-23.

6. Авреньева Л.И., **Балакина А.С.**, Трусов Н.В., Гусева Г.В., Аксенов И.В., Кравченко Л.В. Эффекты раздельного 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.100.

7. Аксенов И.В., **Балакина А.С.**, Трусов Н.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Кравченко Л.В. Эффекты раздельного 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.101.

8. 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.

9. **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.

10. **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.

11. 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.

12. **Балакина А.С.**, Девятков 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.

13. **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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества
БАД – биологически активные добавки
ГАФДГ – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
Гес – гесперидин
ГО-1 – гемоксигеназа-1
И-3-К – индол-3-карбинол
Кур – куркумин
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
Р – рутин
Рес – ресвератрол
ХР – NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза
ЭГКГ – эпигаллокатехингаллат
ARE – антиоксидант-респонсивный элемент
CCl₄ – четыреххлористый углерод
Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1
Nrf2 – NF-E2-ассоциированный фактор 2

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.