

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В.Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет

Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**Роль сигнальної системи Keap1-Nrf2 у регуляції цитопротекторних  
реакцій**

Кваліфікаційна робота

студентки кафедри

молекулярної біології та біотехнології

Чалкової Дар'ї Дмитрівни

Оцінка «\_\_\_\_\_»

Науковий керівник:

професор, доктор біологічних наук

Завідувач кафедри \_\_\_\_\_ А.І. Божков

Клімова Олена Михайлівна

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

Харків 2023

**Анотація:**

Дипломна робота складається з 79 листків друкованого тексту, 6 рисунків, 2 графіків, і налічує 42 джерела використаної літератури.

Робота присвячена проблемі вивчення регуляторних механізмів у біологічних системах. У роботі розглянуто механізми цитопротекторних реакцій у відповіді на окислювальний стрес та цитопротекторні дії зовнішніх середовищних факторів. Розглянуто механізми захисту клітин від вільно-радикальних процесів, що здійснюються дією регуляторних факторів – Nrf2 та Keap1. Ця дипломна робота присвячена вивченню ролі сигнальної системи Keap1-Nrf2 у регуляції цитопротекторних реакцій. Keap1-Nrf2 є ключовим механізмом, що відповідає за захист клітин від окислювального стресу та токсичних впливів. Однак, механізми регуляції Keap1-Nrf2 та його точні функції ще не повністю зрозумілі.

Метою є порівняльний аналіз існуючих методів отримання корегуючих біотехнологічних продуктів, що регулюють гомеостаз. Метою дослідження також є детальний аналіз молекулярних механізмів, що стоять за активацією Nrf2 та його взаємодією з Keap1, а також опис оптимальних шляхів отримання корегуючих речовин-регуляторів гомеостаза.

Дослідження будуть зосереджені на вивченні та аналізі шляхів отримання сировини, що здатна регулювати рівень експресії досліджуваного фактору. У якості такої сировини були обрані куркума та кверцетин. Для них було проведено низку тестів на цитотоксичність, які включали в себе використання водорості *Dunaliella viridis* та тест Терасакі. Також розглядалася можливість отримання Nrf2 рекомбінантним шляхом.

Отримані результати розширяють наше розуміння механізмів, що лежать в основі цитопротекції, і можуть мати практичне значення для розробки нових стратегій лікування різноманітних захворювань, включаючи онкологічні захворювання та захворювання, пов'язані з окислювальним стресом.

**Ключові слова:** Keap1-Nrf2, цитопротекторні реакції, сигнальні шляхи, активація та інгібування, цитотоксичність, *Dunaliella viridis*, тест Тerasaki.

**Abstract:**

The thesis consists of 79 pages of printed text, 6 figures, 2 graphs, and includes 42 references of the used literature.

The work is devoted to the problem of studying regulatory mechanisms in biological systems. Mechanisms of cytoprotective reactions in response to oxidative stress and cytoprotective actions of external environmental factors are considered in the work. Mechanisms of cell protection against free-radical processes carried out by the action of regulatory factors - Nrf2 and Keap1 are considered. This thesis is devoted to the study of the role of the Keap1-Nrf2 signaling system in the regulation of cytoprotective reactions. Keap1-Nrf2 is a key mechanism responsible for protecting cells from oxidative stress and toxic effects. However, the regulatory mechanisms of Keap1-Nrf2 and its precise functions are not yet fully understood.

The goal is a comparative analysis of existing methods of obtaining corrective biotechnological products that regulate homeostasis. The purpose of the study is also to analyze in detail the molecular mechanisms behind the activation of Nrf2 and its interaction with Keap1, as well as the description of optimal ways of obtaining corrective substances-regulators of homeostasis.

The research will focus on the study and analysis of the pathways for obtaining raw materials capable of regulating the expression level of the investigated factor. Turmeric and quercetin were chosen as such raw materials. A series of cytotoxicity tests were conducted using the *Dunaliella viridis* algae and the Terasaki assay. The possibility of obtaining recombinant Nrf2 was also considered.

The obtained results will expand our understanding of the mechanisms underlying cytoprotection and may have practical implications for the development of new treatment strategies for various diseases, including oncological diseases and those associated with oxidative stress.

**Keywords:** Keap1-Nrf2, cytoprotective reactions, signaling pathways, activation and inhibition, cytotoxicity, *Dunaliella viridis*, Terasaki assay.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП.....</b>	<b>10</b>
<b>1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Цитопротекторні системи.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Тимчасова залежність функції клітинних регуляторів (адаптерних білків).....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Перетворення сигналу .....	16
1.2.2. Перемноження сигналу.....	18
1.2.3. Приєднання сигнальних шляхів.....	18
1.2.4. Стабілізація конформації сигнальних вузлів .....	18
<b>1.3. Визначення та структура Nrf2 .....</b>	<b>20</b>
1.3.1. Фізіологічна функція Nrf2 .....	21
1.3.2. Аутофагія.....	22
1.3.3. Запалення та сигналізація запалення.....	23
1.3.4. Стрес ендоплазматичного ретикулуму (ER) і реакція розгорнутого білка (UPR).....	24
1.3.5. Апоптоз і мітохондріальний біогенез.....	25
1.3.6. Функція стовбурових клітин.....	27
<b>1.4. Механізми взаємодії системи Keap1 з Nrf2 .....</b>	<b>28</b>
1.4.1. Білок Keap1 і його роль як регулятора Nrf2 .....	28
1.4.2. Механізм дії системи KEAP1–NRF2.....	28
1.4.2.1. Структурно-функціональні основи системи KEAP1–NRF2 ...	28
1.4.2.2. Сигнальний шлях Nrf2-Keap1.....	30
1.4.3. Структури Nrf2 і Keap1 і цистеїновий код .....	31
<b>1.5. Залежність агресивної проліферації злоякісних клітин від рівня nrf2.....</b>	<b>32</b>
1.5.1. Вплив конститутивної активації Nrf2 на розвиток раку .....	32
1.5.2. Механізми конститутивного ядерного накопичення білка Nrf2 .....	32
1.5.3. Подвійна роль Nrf2 у пухлиногенезі .....	33
1.5.4. Активація NRF2 в імунних клітинах.....	34
1.5.5. Механізм дії кверцетину на експресію Nrf2 .....	35

<b>2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ .....</b>	<b>38</b>
<b>2.1. Метод визначення можливої цитотоксичності сировини для отримання потрібної експресії фактору за допомогою лімфоцитів (тест Терасакі).....</b>	<b>38</b>
2.1.1. Діагностична значимість.....	38
2.1.2. Принцип метода .....	38
2.1.3. Реактиви, зразки та обладнання.....	39
2.1.4. Приготування робочих розчинів .....	39
2.1.4.1. Приготування градієнтного розчину фіколверографіну .....	39
2.1.4.2. Приготування робочого розчину барвників .....	39
2.1.4.2.1. Розчин еозину.....	39
2.1.4.2.2. Розчин метиленового синього .....	39
2.1.5. Проведення аналізу .....	40
2.1.6. Облік результатів.....	41
2.1.7. Засоби виміру та обладнання .....	41
2.1.7.1. Засоби виміру.....	41
2.1.7.2. Додаткове обладнання .....	41
2.1.7.3. Посуд.....	41
2.1.8. Контроль якості метода .....	42
2.1.9. Можливі помилки.....	42
<b>2.2. Метод оцінки інтегральної цитотоксичності сировини для отримання потрібної експресії фактору за допомогою клітинного біосенсора <i>Dunaliella viridis</i> .....</b>	<b>42</b>
2.2.1. Діагностична значимість.....	42
2.2.2. Принцип метода .....	43
2.2.3.2. Обладнання .....	43
2.2.3.3. Зразки .....	43
2.2.4. Приготування робочих розчинів .....	44
2.2.5. Проведення аналізу .....	44
2.2.6. Облік результатів.....	44
2.2.7. Референтні величини .....	45
2.2.8. Діагностичні характеристики .....	46
2.2.9. Заходи безпеки .....	46

2.2.10. Примітки.....	46
2.2.11. Утилізація.....	46
2.3. Патентний пошук літератури по методах отримання шляхом екстракції куркуміна та кверцетину, а також можливих шляхів рекомбінантного впливу на експресію досліджуваного фактору за останні 5 років .....	46
2.3.1. Загальний принцип методу екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE) .....	47
2.3.2. Обладнання, необхідне для екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE) .....	47
2.3.3. Загальний принцип методу екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (EAE) .....	48
2.3.4. Обладнання, необхідне для екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (EAE) .....	50
2.3.5. Загальний принцип отримання Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій.....	51
2.3.6. Обладнання, необхідне для отримання Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій.....	52
3. РЕЗУЛЬТАТИ.....	55
3.1. Метод екстракції кверцетину та куркуміну.....	55
3.1.1. Метод екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE).....	56
3.1.2. Метод екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (EAE).....	56
3.1.2.1 Загальний принцип методу екстракції гарячою водою та методу ферментативного гідролізу.....	56
3.1.2.2. Оптимізація температури, рН і процентного вмісту етанолу в гідролізній частині системи .....	58
3.2. Метод отримання Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій.....	59
3.2.1. Вибір продуцента .....	59
3.2.2. Клонування гену, що кодує білок з <i>Nrf-2</i> , в експресійний вектор .....	60
3.2.3. Отримання та конструювання вектору.....	61
3.2.4. Трансформація рекомбінантного вектора в продукуючу систему, таку як <i>E. coli</i> . або МСК .....	63

3.2.5. Експресія рекомбінантного білка в <i>E. coli</i> .....	63
3.2.6. Очищення рекомбінантного білка за допомогою хроматографії .....	65
3.2.7. Форма отриманого продукту.....	67
3.2.8. Умови подальшого зберігання та використання.....	67
3.3. Оцінка цитотоксичності вихідної сировини (куркуми та сировини) .....	67
3.3.1. Оцінка цитотоксичності за допомогою біоіндикатора <i>Dunaliella viridis</i> .....	67
3.3.2. Оцінка цитотоксичності за допомогою метода Тerasакі.....	69
<b>ЗАКЛЮЧЕННЯ</b> .....	72
<b>ВИСНОВКИ</b> .....	74
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	75

## ВСТУП

Робота присвячена проблемі вивчення регуляторних механізмів у біологічних системах. У роботі розглянуто механізми цитопротекторних реакцій у відповіді на окислювальний стрес та цитопротекторні дії зовнішніх середовищних факторів. Розглянуто механізми захисту клітин від вільно-радикальних процесів, що здійснюються дією регуляторних факторів – Nrf2 та Keap1.

Метою є порівняльний аналіз існуючих методів отримання корегуючих біотехнологічних продуктів, що регулюють гомеостаз.

Для сучасної біотехнології досліджуються сигнальні системи для формування розуміння необхідності отримання тих чи інших активаторів та інгібіторів. Це необхідно для досліджень у фундаментальній біології та використання продуктів в практичній медицині й сільському господарстві. У тому числі вивчаються і цитопротекторні системи-регулятори, до яких належать різні транскрибуючі фактори. Інтенсивно вивчаються механізми регуляції гомеостазу та захисту клітин від екзо- та ендотоксинів і вільних радикалів, що утворюються в процесі життєдіяльності.

Особливу увагу приділяють red-ox системі, зокрема відповіді на окислювальний стрес — фізіологічний стан, при якому існує дисбаланс між продукцією активних форм кисню (АФК) і здатністю механізмів антиоксидантного захисту організму їх нейтралізувати. АФК є високоактивними молекулами, які можуть пошкоджувати клітинні компоненти, такі як білки, ліпіди та ДНК, що призводить до клітинної дисфункції та смерті. Окислювальний стрес може бути наслідком різних факторів, таких як вплив токсинів навколишнього середовища, метаболічні порушення, запалення та старіння [1].

Для збереження клітинного гомеостазу, в тому числі функцій антиоксидантної системи в організмі, існує цілий ряд сполук, що направлені на її регуляцію. Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) є фактором транскрипції, який відіграє ключову роль у захисті клітин від окислювального

стресу, бо він має здатність транслокуватися в клітинне ядро і зв'язуватися з генами антиоксидантних систем ARE, тим самим регулюючи експресію генів-мішеней, зокрема таких мітохондріальних ферментів як НАДФ-Н каталаза, які захищають клітини від шкідливого впливу АФК. Хоча активні форми кисню є корисними та необхідними для підтримання гомеостазу в певних дозах, існує цілий комплекс ферментів, які працюють разом, щоб регулювати рівень АФК і відновити пошкодження, спричинені окиснювальним стресом. Nrf2 також бере участь у регуляції інших клітинних процесів, таких як запалення та апоптоз. Цей фактор має плейотропну дію на наш організм. Загалом Nrf2 керує транскрипцією сотень генів, які кодують безліч білків, що беруть участь у різноманітних клітинних функціях, включаючи гомеостаз білків і органел у відповідь на стресові фактори навколишнього середовища [2, 3].

Цікавим є те, що у міжклітинній взаємодії та регуляторній ролі транскрибуючих факторів велику роль грає етапний аспект. Один і той же фактор може виявляти на різних стадіях розвитку запального процесу або активуючу або інгібуючу дію. Таким чином, етапний фактор відіграє велику роль у реалізації функцій білкових регуляторів [4].

На етапах, де Nrf2 виступає як негативний фактор, його регулятором буде виступати специфічний білок - Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), який є адаптерним білком убіквітінування. Keap1 є негативним регулятором Nrf2, контролюючи його стабільність і деградацію в цитоплазмі. При окислювальному стресі або електрофільному впливі Keap1 модифікується, що призводить до стабілізації Nrf2 і транслокації в ядро, заважаючи його подальшій активації [5].

Таким чином, для біотехнології важливим є отримання адаптерного білка Keap1, оскільки розглянутий сигнальний шлях за участю Nrf2 необхідний для клітинної відповіді на стрес і бере участь у патогенезі різних захворювань, включаючи рак, нейродегенеративні захворювання та запальні розлади. Надактивність фактора Nrf2 та його накопичення в ядрі впливає на

онкопроліферацію клітин, активуючи анаболізм, що сприяє надмірній клітинній проліферації.

Оскільки відомо, що в біотехнології застосовують різні методи отримання природних активаторів системи взаємодії Keap1 з Nrf2. Цей фактор можна отримувати шляхом екстракції з таких природних сполук як: куркумін, поліфеноли, кверцетин і похідні олеїнової кислоти, і тритерпеноїди [6, 7, 8].

Сьогодні система Keap1-Nrf2 стала дуже важливою терапевтичною мішенню при лікуванні раку та нейродегенеративних станів; аутоімунних та запальних захворювань. Розуміння функції та регуляції сигнальної системи Keap1-Nrf2 може запропонувати нові терапевтичні стратегії для запобігання та лікування цих захворювань [9].

**Актуальність:** вивчення закономірностей регуляції біологічних процесів шляхом активаторів та інгібіторів – регуляторів транскрипції генів. Відомо, що одною з основних регуляторних біологічних закономірностей є субстратна активація та субстратне інгібування. Розуміння цих закономірностей необхідно при розробці біотехнологій отримання активаторів та інгібіторів клітинної red-ox системи, оскільки окисно-відновні реакції є важливою ланкою в підтриманні клітинного гомеостазу.

В підтриманні міжклітинної взаємодії бере участь фактор Nrf2. Відомо, що дія цього фактора індукує різноманітні ефекти в залежності від етапу онтогенеза. На певних стадіях цей фактор несе, скоріше, позитивний вплив, в той час як на інших етапах – вплив негативний.

Відомо, що активність функціонального стану Nrf2 регулюється фактором Keap1.

**Мета:** порівняльне дослідження методів отримання Nrf2-регуляторів та оцінка степеню цитотоксичності сировини цільових продуктів.

Задачі:

1) Оцінка та аналіз методів екстракції для отримання цільових продуктів.

2) Оцінка та аналіз метода рекомбінантних технологій отримання цільових продуктів.

3) Оцінка ступеню цитотоксичності продуктів (зокрема куркуміна та кверцитіна): оцінка лімфоцитотоксичності методом Terasaki та оцінка інтегральної цитотоксичності з використанням біоіндикаторів *Dunaliella viridis*.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Цитопротекторні системи

Цитопротекторні системи - це важливий механізм, що забезпечує клітини організму захистом від різних негативних впливів. Ці системи включають в себе різноманітні молекулярні компоненти, які забезпечують стійкість клітин до стресу та зберігають їх життєздатність.

Цитопротекторні системи мають різноманітні захисні функції, включаючи захист клітинних мембран від окислювання, регулювання внутрішньоклітинного рН та утримання гомеостазу різних метаболічних процесів. Ці системи відіграють важливу роль у захисті клітин від стресу, який може бути викликаний різноманітними чинниками, такими як токсичні речовини, температурні коливання, іонізуюче випромінювання та інші.

Цитопротекторні системи можуть бути активовані як за допомогою внутрішніх механізмів, так і за допомогою зовнішніх чинників, наприклад, застосуванням фармакологічних препаратів, що забезпечують захист клітин від негативного впливу.

Оскільки цитопротекторні системи відіграють ключову роль у забезпеченні стійкості клітин до негативного впливу, вивчення їх механізмів та підходів до їх активації має велике значення для розробки нових методів захисту від різноманітних хвороб та ризиків для здоров'я [10].

Різнманітні хронічні захворювання, такі як рак, серцево-судинні та нейродегенеративні захворювання, хронічні респіраторні захворювання, цукровий діабет, пошкодження сітківки та інші, пов'язані з окислювальним стресом. Для профілактики та лікування таких захворювань пропонуються різні природні та синтетичні антиоксиданти. Клітинний захист від окисної та електрофільної токсичності (хіміопротекторна) може бути забезпечений різними способами, включаючи короточасні прямі антиоксиданти або непрямі антиоксиданти, які активують шлях Keap1/Nrf2/ARE та індукують транскрипцію цитопротекторних білків. Індивідуальні антиоксидантні захисні системи людини взаємодіють у складній функціональній взаємодії, де

цитопротекторні білки беруть участь у синтезі та/або регенерації прямих антиоксидантів, які, у свою чергу, є справжніми "антиоксидантними" ефекторами. Пряма антиоксидантна терапія часто не ефективна в клінічних випробуваннях, і останні дослідження в основному підтверджують участь кількох сигнальних шляхів клітин у цитозахисті від окисного стресу [3].

В наукових дослідженнях все більше уваги приділяється механізму дії цитопротекції, зокрема, досліджується цитозахисний механізм природного антоціаніну дельфінідину проти окисного стресу, індукованого  $H_2O_2$ . Він був досліджений на хондроцитах людини і проявився у пригніченні індукованого активними формами кисню апоптозу через активацію Nrf2 і ядерного фактора  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) і активації цитопротекторної аутофагії. Це демонструє потенціал даного антоціаніну у лікуванні остеоартрозу. Ембелін, який є рослинним натуральним продуктом, також має цитопротекторну активність. Він повністю ліквідував супероксидний радикал, утворений *in situ*, та виявив цитопротекторну активність у лейкозних моноцитах людини ТНР-1 і мікроглії мишей BV-2, ймовірно, завдяки своєму довгому алкільному хвосту, що дає змогу вставляти його в клітинні мембрани [11].

## **1.2. Тимчасова залежність функції клітинних регуляторів (адаптерних білків)**

Усі клітини залежать від чітко регульованих сигнальних шляхів, щоб належним чином реагувати на навколишнє середовище. Основна модель припускає, що позаклітинна інформація отримується клітинними поверхневими та/або внутрішньоклітинними рецепторами. Згодом ці сигнали передаються через цитоплазму. Зрештою, інформація може досягти клітинного ядра, де вона транслюється в активацію/інактивацію генів. Отже, зміни в експресії генів повинні призвести до адекватної реакції клітини на зовнішні подразники.

Імунні клітини особливо залежать від жорстко контрольованої передачі інформації ззовні клітини. Ці клітини активно шукають і реагують на безліч

викликів у непередбачуваному середовищі. Крім того, вони повинні постійно бути готові адаптуватися до постійно мінливих умов. Імунні клітини повинні адекватно реагувати, адже від їх активності залежить безпека всього організму [12].

Активовані рецептори запускають складну мережу сигнальних подій, що призводять до модуляції білкової активності або транскрипції генів. Це відбувається через тимчасову зміну залучених сигнальних білків шляхом конформаційної зміни або посттрансляційної модифікації, що зазвичай призводить до утворення мультибілкових комплексів. Групу білків, які є невід'ємними частинами цих сигнальних шляхів, можливо, затьмарили їхні ферментативно активні партнери по зв'язуванню. Ці білки не виконують ферментативних функцій. Оскільки їхня єдина активність — зв'язування, їх назвали адапторними білками. Щоб виконувати свої функції, ці молекули можуть містити збережені домени взаємодії та/або унікальні мотиви зв'язування. Це дозволяє молекулам-адапторам об'єднувати білки та адаптувати сигнальні шляхи.

Унікальна комбінація збережених доменів зв'язування білків і внутрішньо неупорядкованих структур, що містять SLiM, дозволяє молекулам-адапторам контролювати внутрішньоклітинні сигнальні каскади в просторі та часі. Адаптерні білки можуть контролювати локалізацію сигнальних молекул, що визначає простір шляху. Паралельно вони можуть контролювати послідовність ферментативних подій, що визначає час шляху. Ці процеси часто дуже взаємопов'язані [11, 12].

Надалі буде розписано про часові функції адапторних білків.

### **1.2.1. Перетворення сигналу**

Основною функцією білків-адапторів є участь у клітинній сигналізації. Більшість сигнальних каскадів призводять до активації та транслокації факторів транскрипції до ядра. Результуюча змінена експресія гена може відображати ступеневу (аналогічну) відповідь, прикладом якої є експресія

CD69 або CD25 в Т-клітинах, що корелює з кількістю специфічного фактора транскрипції, переміщеного в ядро. Бінарні відповіді є основною частиною клітинного процесу прийняття рішень. Вносячи свій внесок у каскади передачі сигналів, білки-адаптери можуть не тільки забезпечувати градуйовану передачу сигналів, але й уможливлувати цифрові відповіді (з дискретними, бінарними результатами), тривалу, тимчасову або навіть коливальну передачу сигналів [13].

Найважливішою роллю адаптерних молекул у клітинній передачі сигналів є забезпечення правильного порядку подій (специфічність передачі сигналів). Вони досягають цього завдяки своїм доменам зв'язування з відносно високою специфічністю та SLiM. Гнучкість та наявність SLiMs, що перекриваються, значно підвищують функціональність білка в межах сигнального шляху, надаючи йому нечітку динаміку взаємодій або дозволяючи йому брати участь у різних сигнальних шляхах.

Крім того, кількість шляхів, якими сигнальні шляхи можуть керуватися через посттрансляційні молекулярні перемикачі, присутні в SLiM, дуже велика. Найвідоміші механізми включають двійкові перемикачі, перемикачі специфічності, кумулятивні перемикачі, перемикачі авідності та послідовні перемикачі. Усі ці механізми можуть встановлювати та контролювати порядок подій у сигнальному шляху.

Послідовність подій є ключовим моментом усіх сигнальних каскадів, і будь-яка помилка може призвести до катастрофічних наслідків навіть для всього організму. Адаптерні білки можуть запобігти неспецифічним або неадекватним молекулярним подіям через функціональне неправильне згортання. Невпорядковані ділянки дозволяють білку уникнути неспецифічних (неприродних) взаємодій шляхом динамічного секвестру мотивів розпізнавання через структурні зміни навколишньої послідовності [4].

### **1.2.2. Перемноження сигналу**

Хоча послідовність подій у сигнальному каскаді має велике значення, сила (множення) сигналу однаково актуальна для будь-якого сигнального шляху. Обчислювальне моделювання вказує на те, що молекули-адаптери можуть регулювати тривалість сигналу. Як описано вище, білки-адаптери є чудовими молекулярними концентраторами, які можуть посилювати та стабілізувати сигнал шляхом рекрутування кількох білків. Однак більш потужним способом збільшення сигналу є олігомеризація, яка може призвести до створення розділених фазою мікродоменів. Це простий, але надзвичайно ефективний метод множення функції молекулярного центру [4].

### **1.2.3. Приєднання сигнальних шляхів**

Необхідність активації через кілька різних рецепторів найкраще ілюструється спільною передачею сигналів TCR. Необхідність тонкої настройки відповіді Т-клітин за допомогою корецепторів чітко проілюстрована розвитком технології Т-клітин CAR. Перше покоління Т-клітин CAR погано імітувало поведінку природно активованих Т-клітин і пізніше було вдосконалено шляхом включення в конструкцію CAR двох внутрішньоклітинних доменів корецепторів Т-клітин. Це спостереження підтверджує думку про те, що координація належної активації імунних клітин, де кілька сигнальних шляхів повинні бути активовані одночасно, вимагає великої кількості молекул-адапторів. Це стосується адаптерів FYB1 і SKAP1, які перетворюють шлях TCR на вихідний сигнал за допомогою інтегрин-опосередкованої адгезії. Іншим прикладом є адаптер GRB2, який необхідний корецептору Т-клітин CD28 для викликання продукції IL-2,119 важливої частини належної активації Т-клітин [12, 13].

### **1.2.4. Стабілізація конформації сигнальних вузлів**

Адаптерні білки можуть контролювати ферментативну активність через алостеричний контроль. Зокрема, це стосується псевдокіназ, які можна

сприймати як адаптерні білки через втрату ними ферментативної активності. Наприклад, на шляху ERK псевдокіназа KSR може активувати RAF-кіназу шляхом її зв'язування. Інші адаптери також можуть впливати на ферментативну активність. активність їхніх партнерів по зв'язуванню, таких як фосфорильований PAG1, який підвищує активність тирозинкінази CSK у 6 разів, значно впливаючи на активацію TCR. Подібним чином, зв'язування SLP-76 ІТК стабілізує активний стан кінази, дозволяючи ІТК виконувати свої функції. Аlostеричну модуляцію також можна розуміти як конформаційні зміни, які сприяють диференціальним перевагам зв'язування в результаті взаємодії з адаптерним білком. Такий випадок був описаний для взаємодії між LAT і GRB2, де зв'язування з одним фосфотирозином посилюється при фосфорилуванні іншого тирозину. Крім того, білки-адаптори забезпечують стимулюючу платформу для ферментативних реакцій. Це називається субстратним (метаболічним) каналуванням і відноситься до швидкого перенесення субстрату між двома наступними ферментами [14]. Подібне явище було зареєстровано між протеїнкіназою С та її адаптером AKAP7, але замість цього його називали моделлю перемикачання стану каркасу. 126 Автори додатково підтвердили здатність адаптора ізолювати фермент як від конкуренції субстрату, так і від конкуренції АТФ, але не конкуренції активації. Нарешті, важливим аспектом взаємодії між адапторними молекулами та відповідними ферментами є захист фрагментів. Прикладом цього є коли домен SH2 зв'язується з фосфорильованим тирозином, таким чином захищаючи його від фосфатаз.

Підсумовуючи, адаптерні білки відіграють вирішальну роль у тонкому налаштуванні сигнальних шляхів. Таким чином, можна очікувати, що за відсутності даної молекули-адаптора фізіологічні процеси будуть порушені, що призведе до захворювання людини. Враховуючи важливість клітинних сигнальних механізмів для гнучкості та надійності імунних реакцій, ймовірно, що гени, що кодують молекули-адаптори, можуть сприяти виникненню різних фенотипів захворювань [14, 15].

### 1.3. Визначення та структура Nrf2

Nrf2, також відомий як ядерний фактор (еритроїдний 2)-подібний 2 (NFE2L2), кодується геном NFE2L2, розташованим на хромосомі 2 людини [2].

Nrf2 складається з семи білків Nrf2-еритроїдної клітини з гомологічними доменами CNC (ECH), відомими як Neh, кожен з яких є вирішальним для його належного функціонування. Neh1 містить CNC-bZIP, що дозволяє йому зв'язувати промоторні ділянки ДНК і малі м'язово-апоневротичні фібросаркоми (sMAF). Тим часом Neh 3, 4 і 5 беруть участь в активації Nrf2 через транскрипційні коактиватори. Neh4 і Neh5 зв'язуються зі зв'язуючим білком (CBP) циклічного аденозинмонофосфатного елемента відповіді (CREB), тоді як Neh3 зв'язується з хромо-АТФаза/геліказа ДНК-зв'язуючим білком 6 (CHD6). Крім того, Neh5 відповідає за внутрішньоклітинну локалізацію Nrf2 і містить окисно-відновний пептид сигналу ядерного експорту (NES), який регулює його розташування. На убіквітування та протеосомну деградацію Nrf2 впливають Neh2 і Neh6, тоді як домен Neh2 містить дві амінокислотні ділянки. Ці ділянки є мотивами послідовності DLG і ETGE, які поєднуються з Kelch-подібним до ECH-асоційованим білком 1 (Keap1) і сімома залишками лізину між ETGE і DLG для посередництва убіквітування. Це дозволяє Nrf2 зв'язуватися з убіквітинлігазним комплексом E3 на основі cullin3 (CUL3)-ring-box1 (RBX1). Інгібування Nrf2 без участі Keap1 використовує фосфорилування Neh6 глікогенсинтазекіназою-3 (GSK-3), що вимагає лігування убіквітину E3 білка, що містить повтори ( $\beta$ -TrCP), що містить  $\beta$ -трансдукцію, за допомогою двох пептидних мотивів – DSGIS і DSAPGS. Репресивний домен Neh7 працює через фізичний контакт між собою та репресором альфа-рецептора ретиноїду X (RXR- $\alpha$ ) (рис. 1) [3].

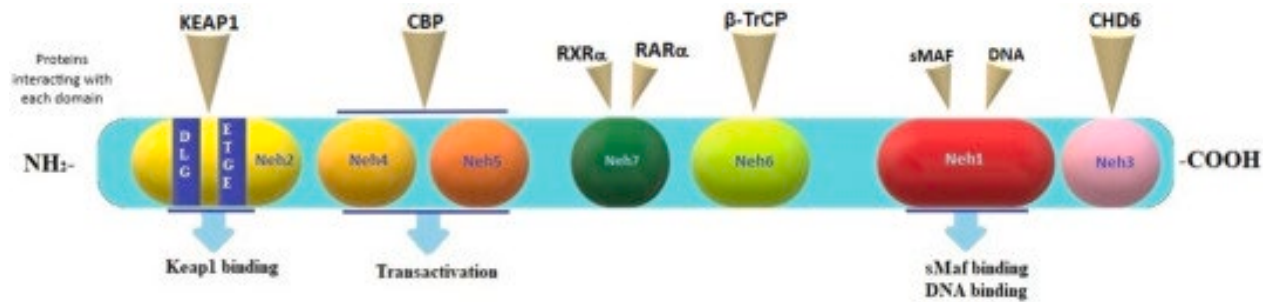


Рисунок. 1. Структура ядерного фактора еритроїдного 2-спорідненого фактора 2 (Nrf2), з білками, що зв'язуються з кожним доменом.

### 1.3.1. Фізіологічна функція Nrf2

Фізіологічна функція полягає в активації експресії генів, що кодують різні антиоксидантні ферменти та ферменти детоксикації фази II для захисту клітин від окислювального стресу та інших шкідливих впливів. Nrf2 є основним регулятором клітинної антиоксидантної реакції, і його активація відіграє вирішальну роль у підтримці клітинного гомеостазу.

За нормальних умов Nrf2 постійно синтезується та розкладається в цитоплазмі Keap1 (Kelch-подібний ECH-асоційований білок 1), який діє як негативний регулятор Nrf2. Однак в умовах окислювального стресу Keap1 модифікується, що призводить до стабілізації та транслокації Nrf2 до ядра. Потрапляючи в ядро, Nrf2 зв'язується зі специфічними ділянками ДНК і активує транскрипцію цільових генів, що кодують антиоксидантні ферменти, такі як глутатіон S-трансфераза, гемоксигеназа-1 і NAD(P)H хіноноксидоредуктаза 1 (NQO1), а також як ферменти детоксикації фази II, такі як UDP-глюкуронозилтрансфераза та глутатіонпероксидаза [16].

Завдяки активації цих генів Nrf2 сприяє детоксикації активних форм кисню (АФК) та інших електрофільних молекул, а також видаленню пошкоджених білків і органел, тим самим зменшуючи пошкодження клітин і підтримуючи клітинний гомеостаз. Було показано, що активація Nrf2 має сприятливий вплив на різні моделі захворювань, включаючи нейродегенеративні захворювання, рак і запалення.

Оксиданти стимулюють кілька програмних функцій. Недавні результати досліджень показують, що Nrf2 відіграє певну роль у регуляції цих функцій [3].

### 1.3.2. Аутофагія

Макроаутофагія — це збережений шлях деградації основного білка, відповідальний за оборот білків, що живуть довго, утилізацію надлишку або пошкоджених органел і очищення білків, схильних до агрегації. Аутофагія має важливе значення для ведення домашнього господарства та індукується в ряді стресових реакцій. Аутофагія супроводжується накопиченням АФК з пошкоджених мітохондрій. Отримана з мітохондрій  $H_2O_2$  може стимулювати аутофагію шляхом окислення реактивних залишків цистеїну білків, кодованих основними генами аутофагії, такими як *ATG4*, для збільшення загального утворення аутофагосом.

У мишей з дефектом аутофагії Nrf2 надмірно активований і пов'язаний із патологією печінки, яка спостерігається у мишей, оскільки втрата Nrf2 полегшувала, але втрата Keap1 посилювала пошкодження печінки, викликане дефіцитом аутофагії. Ключовим зв'язком між аутофагією та Nrf2 є p62, субстрат аутофагії та рецептор аутофагічного вантажу (рис. 2 а). Втрата аутофагії викликає помітне накопичення p62, що, у свою чергу, пригнічує Keap1 для активації Nrf2 і збільшення експресії гена ARE. p62 зв'язується з Keap1 через свій мотив KIR; KIF містить послідовність STGE, яка має афінність зв'язування з Keap1 DC, подібну до Nrf2 DLG. p62 також індукується окислювальним стресом через Nrf2 і ARE, створюючи позитивну петлю зворотного зв'язку між накопиченням p62 і активацією Nrf2 при дефіциті аутофагії. Toll-подібні рецептори (TLR) впливають на кілька вроджених імунних реакцій, регулюючи аутофагію. p62 посилюється в опосередкованій TLR4 селективній аутофагії агресомоподібних індукованих структур (ALIS). І накопичення p62, і ALIS вимагали активації Nrf2 через залежну від осі ROS-p38 передачу сигналів TLR4/MyD88 [16].



Інфламмасоми є молекулярною платформою, необхідною для повноцінного функціонування вродженої імунної системи. АФК окислюють цистеїнові тіоли активного центру Trx, викликаючи дисоціацію TXNIP від Trx; звільнений TXNIP зв'язується з NLRP3, щоб індукувати надійну активацію інфламмасоми (Рис. 26) Ефективна активація запалення залежить від окисно-відновного стану макрофагів, який регулюється циклом цистин/цистеїн і транспортером цистину, xCT [13].

Кристали холестерину поглинаються макрофагами, щоб стимулювати запалення під час атерогенезу. Кристали холестерину активували Nrf2 та індукували Nrf2-регульовані гени *Nqo1*, *Hmox1* та *Prdx1*; крім того, Nrf2 був необхідний для реакції запалення, спричиненої кристалами холестерину. У цьому сценарії Nrf2 був активований як адаптивний захист від окисного стресу під час запалення. У той же час Nrf2 посилив атерогенез, підтримуючи запалення судин, опосередковане IL-1 $\beta$ , викликане кристалами холестерину.

Таким чином, наслідки активації Nrf2 активаторами запалення NLRP3 можуть відрізнятися залежно від активаторів, типу клітин і патології. Nrf2 може впливати на сигналізацію запалення декількома способами: індукція антиоксидантних генів для протидії збільшенню ROS; індукція xCT і Trx для регуляції окисно-відновного стану моноцитів; придушення транскрипції TXNIP для зменшення кількості TXNIP; та сприяння виробленню IL-1 $\beta$  для атерогенезу (Рис. 26 ). [16]

#### **1.3.4. Стрес ендоплазматичного ретикулуму (ER) і реакція розгорнутого білка (UPR)**

Накопичення розгорнутих і неправильно згорнутих білків або надмірний обмін білками в просвіті ER спричиняє стрес ER, який запускає реакцію розгорнутого білка (UPR). UPR використовує еволюційно збережені сигнальні шляхи для відновлення нормальної функції клітини за наявності стресу ER і, якщо гомеостаз не досягнутий, ініціює апоптоз. Серед сигнальних молекул UPR PERK (протеїнкіназа РНК-подібна кіназа ендоплазматичного

ретикулуму) фосфорилує  $\alpha$ -субодиницю eIF2, викликаючи ослаблення загального синтезу білка та сприяючи виживанню клітин у стресі ER. UPR регулюється АФК і окисно-відновними системами в ER [2, 3].

Сигаретний дим (CS) і дим від палива з біомаси, наприклад вихлопних газів дизельного палива, викликають запалення в дихальних шляхах, що потенційно призводить до хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ). CS і дизельні вихлопні гази містять дрібні частинки, які, здається, не активують інфламмасому NALP3 у макрофагоподібних клітинах людини, як це роблять частинки азбесту та кремнезему. З іншого боку, легеневі тканини курців продемонстрували підвищену експресію білків, характерних для стресу ER та UPR, включаючи кальретикулін, PDI та білок, що регулюється глюкозою; крім того, CS індукував UPR і активував Nrf2, щоб індукувати декілька генів антиоксидантів у трансформованих епітеліальних клітинах дихальних шляхів людини. Механізм, за допомогою якого UPR активує Nrf2, може включати PERK. PERK фосфорилує Nrf2 на Thr-80, щоб активувати Nrf2 і індукувати гени ARE, які підвищують рівень GSH, знижують ROS в ER і сприяють виживанню (Рис. 2 с). Nrf2 посилює регуляцію резидентних антиоксидантних ферментів ER, таких як GPx8. UPR, викликаний CS і вихлопними газами дизеля, також активує сигнальний шлях NF- $\kappa$ B для стимуляції прозапального виробництва цитокінів, який інгібується Nrf2 [16].

### **1.3.5. Апоптоз і мітохондріальний біогенез**

Мітохондрії виконують багато функцій, крім того, що вони є джерелом енергії для синтезу АТФ. Мітохондрії є основним місцем виробництва АФК і мішенню багатьох токсикантів. Мітохондрії служать центральним місцем, де перетинаються більшість шляхів апоптозу. Мітохондрії містять нехромосомну ДНК і піддаються біогенезу для поповнення, який координується кількома факторами транскрипції, включаючи ядерний респіраторний фактор 1 (NRF-1).

Nrf2 впливає на мітохондріальну фізіологію та патологію кількома способами (Рис. 2д). Клітини Nrf2 KO демонструють підвищений спонтанний апоптоз і є високочутливими до хімічно індукованого пошкодження мітохондрій, тоді як активація Nrf2 хіміопротекторними агентами захищає від пошкодження мітохондрій. Nrf2 сприяє мітохондріальному біогенезу в мишачих кардіоміоцитах [2, 9].

Nrf2 безпосередньо регулює мітохондріальний гомеостаз ROS шляхом ( *a* ) сприяння детоксикації пероксидів через Prx3 і GPx; ( *b* ) регенерація Trx2, GSH і Prx3-SO<sub>2</sub> H через TrxR, GSR і Srx1 відповідно; ( *c* ) підвищення синтезу GSH і NADPH; і ( *d* ) інгібування експресії TXNIP. Nrf2-Keap1 утворює потрійний комплекс із PGAM5, який локалізується на зовнішній мембрані мітохондрій через N-кінцеву послідовність мітохондріальної локалізації PGAM5; ця мітохондріальна локалізація може дозволити Nrf2 безпосередньо відчувати та реагувати на мітохондріальну АФК. Інгібування експресії TXNIP за допомогою Nrf2 знижує концентрацію TXNIP у мітохондріях для звільнення Trx від TXNIP; знижений Trx зв'язується з ASK1 і інгібує ASK1-залежний мітохондріальний апоптоз. Для мітохондріального біогенезу ендогенний оксид вуглецю, що генерується HO-1, стимулює регуляцію MnSOD і мітохондріальний H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> виробництво для активації Акт/ПКБ; Акт деактивує GSK-3β, який активує Nrf2; Nrf2 зв'язується з чотирма ARE в енхансері гена, що кодує NRF-1, щоб індукувати NRF-1; NRF-1 координує активацію гена для мітохондріального біогенезу для підвищення стійкості до окисних токсикантів. DJ-1 переміщується в мітохондрії після окислювального стресу, щоб захистити мітохондрії. Втрата DJ-1 збільшує виробництво ROS, пошкодження мітохондрій, аутофагію та мітофагію, що супроводжується пригніченням генів Nrf2 та ARE. DJ-1 активує Nrf2, перешкоджаючи зв'язуванню Nrf2-Keap1, і Nrf2 може посилювати експресію DJ-1 через ARE-подібну енхансерну послідовність DJ-1 [9, 16].

### 1.3.6. Функція стовбурових клітин

Кілька типів стовбурових клітин і клітин-попередників демонструють низькі внутрішньоклітинні концентрації АФК, що може служити критичною умовою для плюрипотентності; з іншого боку, для належної диференціації мієлоїдних клітин-попередників необхідне збільшення АФК. Таким чином, внутрішньоклітинний окислювальний-відновний баланс ретельно регулюється в стовбурових клітинах для модуляції регенеративних процесів. Зв'язок між Nrf2 і функціями стовбурових клітин у тканинах з високим оборотом був запропонований в останніх дослідженнях. Кишкові стовбурові клітини дрозоді (ISC) реагують на окислювальний стрес і запалення збільшенням проліферації, яка є регенеративною відповіддю, але може призвести до гіперпроліферації та дегенерації епітелію у старих мух. Nrf2 конститутивно активний в ISC, і репресія Nrf2 Keap1 необхідна для проліферації ISC. Втрата Nrf2 в ISC спричинила накопичення ROS і прискорену залежну від віку дегенерацію епітелію кишечника. Таким чином, Nrf2 сприяє кишковому гомеостазу мухи, регулюючи внутрішньоклітинний окисно-відновний баланс ISC. Nrf2 також необхідний для виживання гемопоетичних стовбурових клітин-попередників (HSPC) і розвитку мієлоїду у мишей; Кістковий мозок Nrf2 KO продемонстрував дефектну функцію стовбурових клітин, про що свідчить зменшений химеризм після трансплантації. Базальний рівень ROS у кістковому мозку Nrf2 KO не був підвищений порівняно з диким типом; проте Nrf2 KO HSPCs мали підвищені показники спонтанного апоптозу та зниження виживаності під впливом окисного стресу, що вказує на критичну роль Nrf2 у кровотворенні та виживанні стовбурових клітин у мишей [9, 17].

Загалом, фізіологічною функцією Nrf2 є захист клітин від окислювального стресу та інших шкідливих впливів шляхом сприяння експресії генів антиоксидантів і детоксикації, таким чином підтримуючи клітинний гомеостаз і запобігаючи захворюванням.

## **1.4. Механізми взаємодії системи Keap1 з Nrf2**

### **1.4.1. Білок Keap1 і його роль як регулятора Nrf2**

Kelch-подібний ECH-асоційований білок 1 (Keap1) — це молекула, збагачена тіолом-цистеїном, яка утворює комплекс з Cullin3 (Cul3) та іншими факторами та діє як молекула-адаптер для лігазного комплексу убіквітину E3.

Keap1 складається з 685 амінокислотних залишків і містить багато реактивних залишків цистеїну: 25 у мишей і 27 у людей.

Він містить три функціональні домени, а саме N-кінцевий домен Broad Complex Tramtrack Bric-a-Bric (BTB), центральну проміжну область (IVR) і C-кінцевий домен подвійного гліцинового повтору (DGR), який складається з карбокси-термінальний регіон (CTR) і домен подвійного гліцинового повтору (DGR). З цих доменів домен BTB є критичним для гомодимеризації Keap1 і зв'язування з CUL3. Було показано, що залишки цистеїну в Keap1 ковалентно зв'язуються з електрофілами та ROS, діючи як сенсори для токсичних хімікатів. Дослідження *in vitro* на рибах і мишах показали, що в Keap1 є три критичні залишки цистеїну: Cys151 в домені BTB і Cys273 і Cys288 в IVR, які взаємодіють з різними індукторами Nrf2 через свою електрофільну природу. Електрофіли можна розділити на п'ять груп залежно від того, з яким цистеїном вони взаємодіють, а також їх електрофільних і неелектрофільних індукторів [18].

## **1.4. 2. Механізм дії системи KEAP1–NRF2**

### **1.4.2.1. Структурно-функціональні основи системи KEAP1–NRF2**

В умовах спокою NRF2 підлягає швидкій деградації через систему протеасом. Однак, під впливом стресу залишки цистеїну в KEAP1 модифікуються, і KEAP1 втрачає активність убіквітинлігази, дозволяючи NRF2 мігрувати в ядро.

Система KEAP1–NRF2 є головним регулятором відповіді на окислювальний та електрофільний стрес в організмі людини. KEAP1 є датчиком стресу та убіквітинлігазою NRF2. У умовах спокою KEAP1 поліубіквітує NRF2, що призводить до швидкої деградації NRF2 через систему

протеасом. Активні форми кисню (АФК) та електрофіли індуюють модифікацію цистеїн-тіолових фрагментів на KEAP1, полегшуючи втечу NRF2 від убіквітування. Таким чином, NRF2 накопичується в цитоплазмі, що призводить до його транслокації в ядро.

У ядрі NRF2 утворює гетеродимер з молекулою sMAF і зв'язується з мотивом зв'язувальних елементів CNC–sMaf (CsMBE) або елемента, що реагує на антиоксиданти (ARE), що призводить до транскрипції батареї антиоксидантів. AREs і EpREs спільно називаються CNC-sMaf binding elements (CsMBEs). Структурно-функціональні основи системи KEAP1–NRF2 показані на рисунку 3 [19].

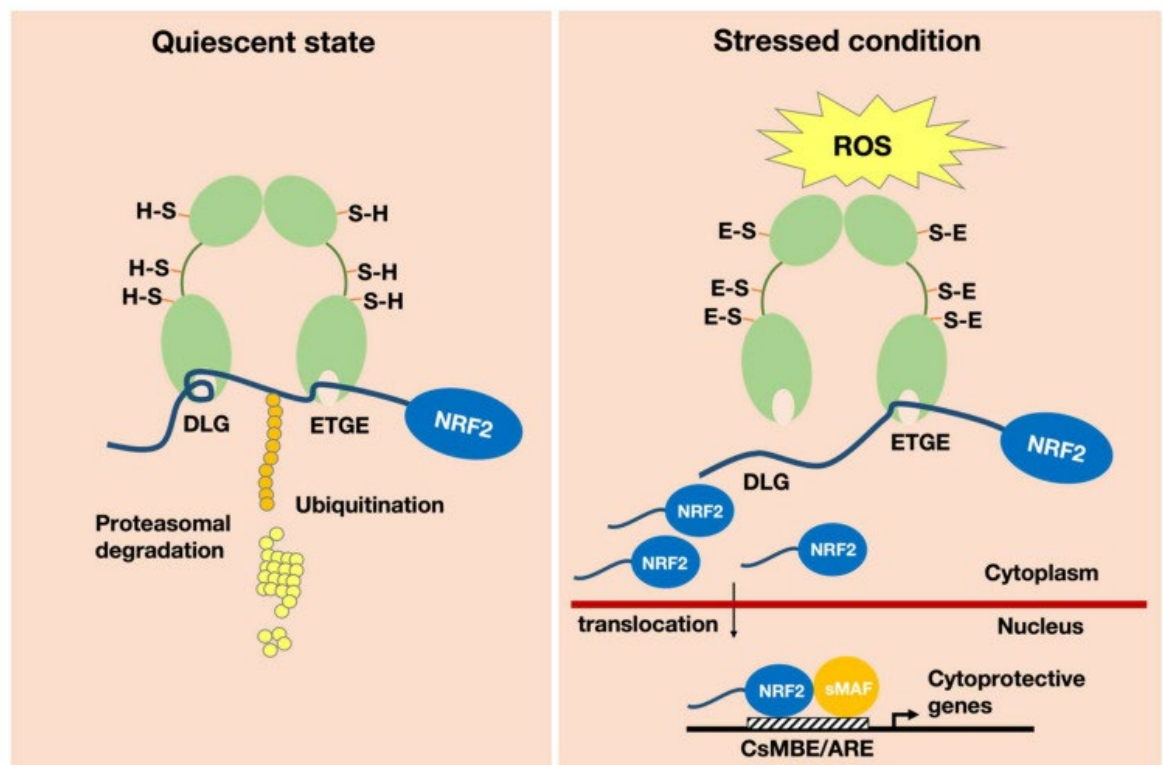


Рисунок 3. DLG – дископодібний білок; мотив ETGE є єдиною структурою  $\beta$ -шпильки, яка щільно зв'язується з кишенькою в домені Кеар1-DC за принципом «ключ і замок»; Кеар-1 розташований зліва, тоді як Nrf-2 показаний праворуч унизу.

У клітинах без стресу NRF2 постійно деградує, але під впливом окисного або електрофільного стресу залишки цистеїну в KEAP1 модифікуються, NRF2 швидко накопичується в ядрі.

#### 1.4.2.2. Сигнальний шлях Nrf2-Keap1

В базових умовах дві молекули Keap1 зв'язуються з Nrf2, а Nrf2 поліубіквітується лігазним комплексом E3 на основі Cul3. Ця поліубіквітація призводить до швидкої деградації Nrf2 протеасомою. Невелика частка Nrf2 вислизає від інгібторного комплексу та накопичується в ядрі, щоб опосередкувати базальну ARE-залежну експресію гена, таким чином підтримуючи клітинний гомеостаз (рис.4 (A і B)) [2].

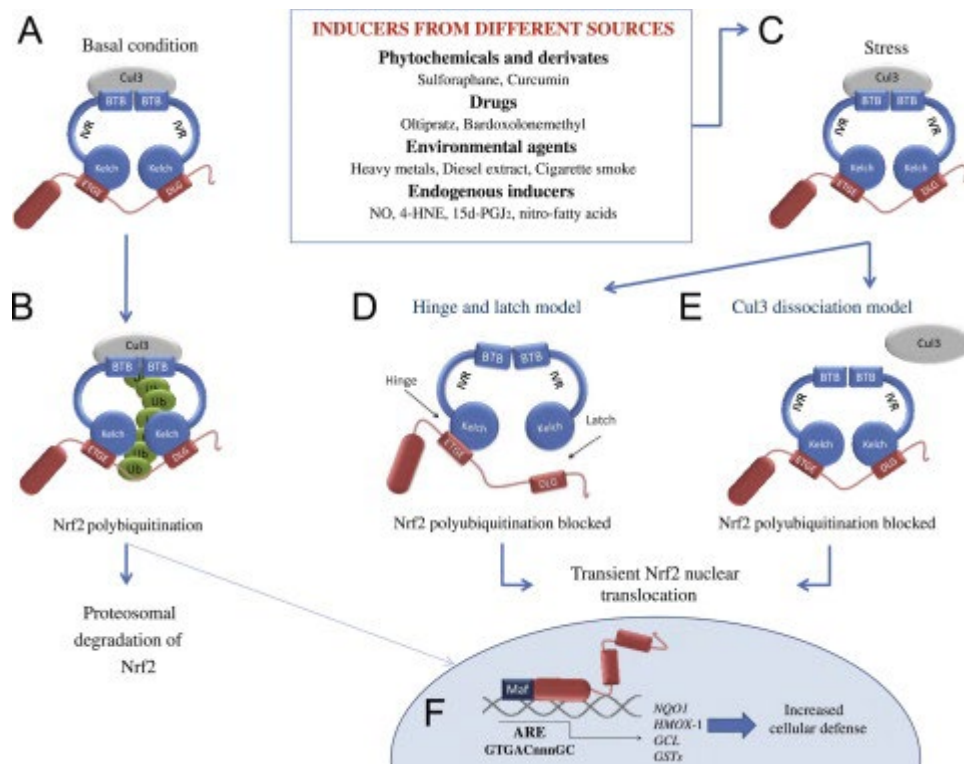


Рисунок 4. Сигнальний шлях Nrf2-Keap1 в різних умовах.

В умовах стресу індуктори модифікують цистеїни Keap1, що призводить до інгібування убіквітування Nrf2 через дисоціацію інгібторного комплексу (рис.4 (C)). Відповідно до моделі шарніра та засувки, модифікація специфічних залишків цистеїну Keap1 призводить до конформаційних змін у Keap1, що призводить до від'єднання мотиву Nrf2 DLG від Keap1. Убіквітування Nrf2 порушується, але зв'язування з мотивом ETGE

залишається (рис.4 (D)). У моделі дисоціації Keap1-Cul3 зв'язування Keap1 і Cul3 порушується у відповідь на електрофіли, що призводить до виходу Nrf2 із системи убіквітування. В обох запропонованих моделях модифікований індуктором і зв'язаний з Nrf2 Keap1 інактивується, і, отже, щойно синтезовані білки Nrf2 обходять Keap1 і переміщуються в ядро, зв'язуються з елементом антиоксидантної реакції (ARE) і стимулюють експресію мішені Nrf2. гени, такі як NQO1, HMOX1, GCL і GSTs (рис.4 (E)) [2, 19].

### **1.4.3. Структури Nrf2 і Keap1 і цистеїновий код**

Keap1 містить 27 залишків цистеїну, які можуть бути модифіковані електрофілами. Гіпотеза цистеїнового коду передбачає, що структурно різні активатори Nrf2 впливають на різні цистеїни Keap1. Модифікації цистеїну призводять до конформаційних змін у Keap1, порушуючи взаємодію між доменами Nrf2 DLG і Keap1 Kelch, таким чином пригнічуючи поліубіквітування Nrf2.

Більшість індукторів ARE (антиоксидантна відповідь) можуть модифікувати цистеїни в Keap1 (білок, що регулює експресію генів, пов'язаних з окислювальним стресом), що дозволяє їм взаємодіяти з Nrf2 (фактор транскрипції, який регулює гени, що захищають від окислювального стресу) і спричинює накопичення Nrf2 в ядрі. Це базується на дослідженнях, проведених на мишах, де було ідентифіковано 5 цистеїнів у Keap1, які є найбільш реактивними щодо дексаметазону 21-мезилату (DexMes), але для Keap1 людини ці цистеїни не були вивчені. Важливість цистеїнів C273 і C288 в пригніченні активації ARE була демонстрована в дослідженнях мутагенезу на мишах і людях. Дослідження цієї системи є важливим для розуміння механізмів захисту клітин від окислювального стресу. [20].

## **1.5. Залежність агресивної проліферації злоякісних клітин від рівня nrf2**

### **1.5.1. Вплив конститутивної активації Nrf2 на розвиток раку**

Nrf2 є важливим фактором в захисті клітин від окисного стресу. Активація Nrf2 призводить до координованої активації генів, які кодують антиоксидантні та детоксикаційні білки. Однак, конститутивне накопичення Nrf2 може також надати раковим клітинам стійкість до хіміотерапії та променевої терапії, що приводить до росту злоякісних пухлин. Ці види раку називають NRF2-залежним/NRF2-активованим раком.

Ракові клітини, що залежні від Nrf2, можуть бути важко контрольовані в клініці, оскільки вони мають надзвичайну проліферацію та резистентність до протипухлинної терапії. Соматичні мутації в генах KEAP1 і NRF2 часто спостерігаються у різних видах раку. Рецидивні мутації KEAP1 і NRF2 виявлені у великих пухлинах голови та шиї, верхніх відділів травного тракту та нирково-клітинної карциноми. Міссенс-мутації в Cul3 також часто спостерігаються в голові та шиї та папілярній нирково-клітинній карциномі. В результаті цього можна зробити висновок, що конститутивна активація Nrf2 має вплив на розвиток раку [21].

### **1.5.2. Механізми конститутивного ядерного накопичення білка Nrf2**

Механізми конститутивного ядерного накопичення білка Nrf2 важливі для розвитку ракової патології. Хоча Nrf2 відіграє важливу роль в захисті клітин від окислювального стресу, його конститутивна активація може призвести до росту пухлин та хіміорезистентності. Було описано кілька механізмів, які приводять до конститутивної активації Nrf2 у ракових клітинах [21, 22].

Перший механізм полягає в соматичних мутаціях Nrf2 або Keap1, які порушують взаємодію між цими двома білками. У Nrf2 мутації впливають на мотиви ETGE і DLG, але в Keap1 мутації розподілені більш рівномірно. Крім того, активація онкогенів, наприклад Kras G12D або руйнування пухлинних

супресорів, таких як PTEN, можуть призвести до індукції транскрипції Nrf2 і збільшення ядерного накопичення Nrf2 (рис. 5 (A)).

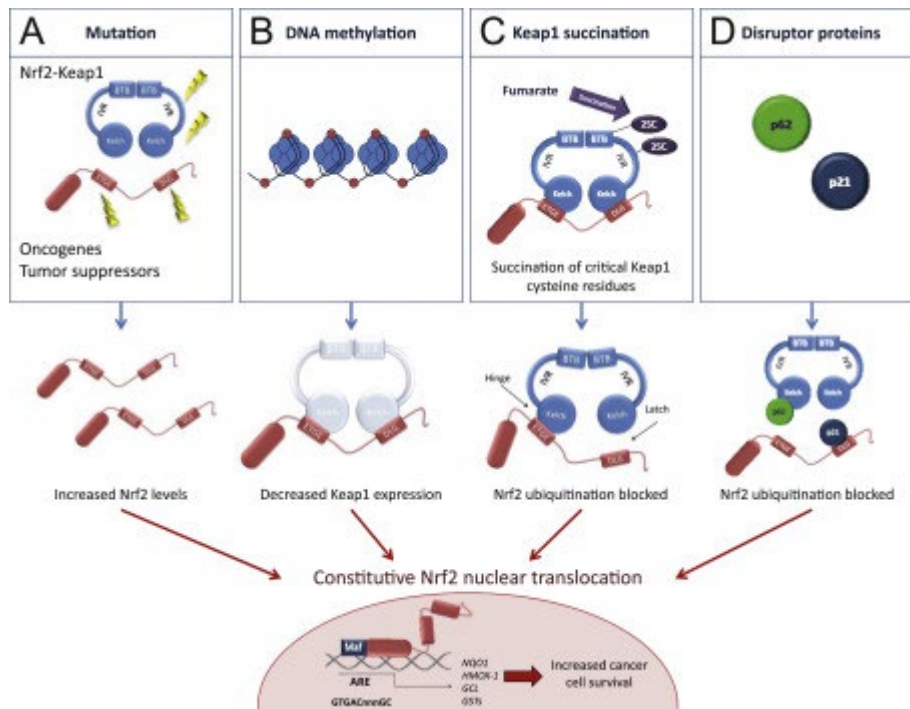


Рис. 5. Механізми конститутивного ядерного накопичення білка Nrf2 [21]

Другий механізм полягає в гіперметилуванні промотору Кеар1 при раку легенів і простати, що призводить до зниження експресії мРНК Кеар1 та збільшення ядерного накопичення Nrf2 (рис. 5 (B)).

Третій механізм включає втрату активності ферменту фумаратгідратази (рис. 5 (C)).

Четвертий механізм включає в себе накопичення дизруптивних білків, таких як p62 і p21, може порушити зв'язування Nrf2-Кеар1 і призвести до збільшення ядерного Nrf2. p62 зв'язується з Кеар1, перекриваючи зв'язувальну кишеню для Nrf2, а p21 безпосередньо взаємодіє з мотивами DLG і ETGE Nrf2, тим самим конкуруючи з Кеар1 (рис. 5 (D)) [21].

### 1.5.3. Подвійна роль Nrf2 у пухлиногенезі

У фізіологічних умовах Nrf2 відіграє важливу роль у підтримці здорового функціонування клітин. Він допомагає забезпечити гомеостаз, що означає рівновагу між різними процесами в клітині. Nrf2 також захищає

клітину від канцерогенів, ROS та інших агентів, які можуть пошкодити ДНК і призвести до розвитку раку [2].

Проте, коли клітина перетворюється на злоякісну, Nrf2 може стати шкідливим. Накопичення пошкодження ДНК викликає гіперактивність Nrf2, що допомагає раковій клітині витримувати високі рівні ендогенних АФК і уникнути апоптозу, тобто програмованої смерті клітини. Це дозволяє злоякісним клітинам прискорити свій ріст і розмноження [23].

Ракові клітини з високим рівнем Nrf2 можуть бути більш радіо- та хіміорезистентними і агресивними, що погіршує прогноз. Таким чином, на ранніх стадіях пухлиногенезу активність шляху Nrf2 є захисною, але на пізніших стадіях – шкідливою, як показано на рисунку 6 [21].

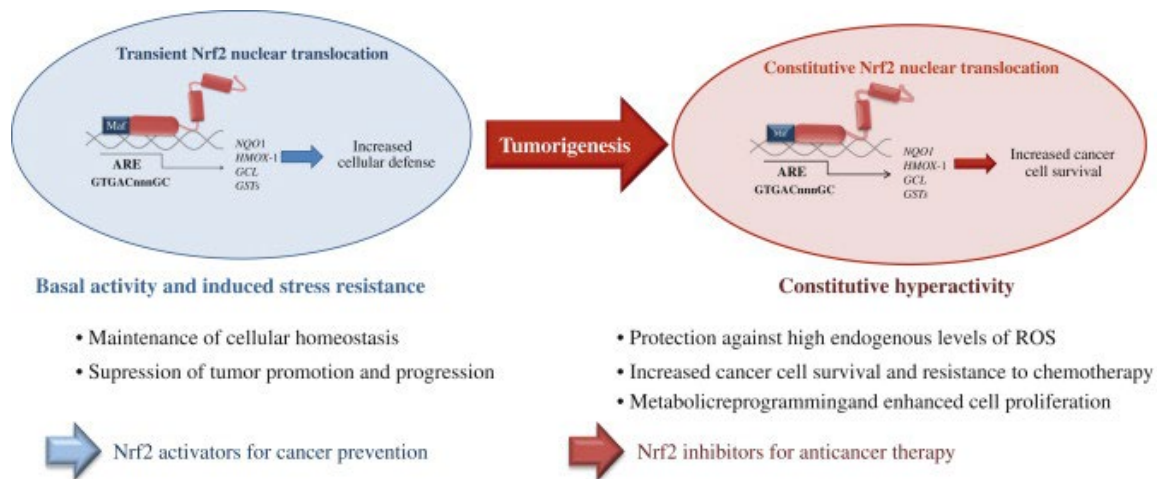


Рис. 6. Подвійна роль Nrf2 у пухлиногенезі

Отже, збільшення активності Nrf2 може бути важливим для профілактики раку, тоді як зниження її активності може бути ефективним для лікування раку.

#### 1.5.4. Активація NRF2 в імунних клітинах

Активація NRF2 в імунних клітинах призводить до придушення пухлини. Активація NRF2 у клітинах імунної системи призводить до придушення аномального росту ракових клітин. Мієлоїдні супресорні клітини (MDSC) є важливими у мікрооточенні пухлин, а їх наявність в організмі зв'язують зі зниженням виживаності та збільшенням ризику смерті від раку.

MDSC мають пригнічувальний вплив як на вроджений, так і на адаптивний імунітет, що сприяє підвищенню імунної толерантності пухлини. Внутрішньоклітинні антиоксидантні фактори (АФК) відіграють ключову роль у пригніченні імунітету MDSC. Підвищення ROS в MDSC пригнічує активацію та проліферацію CD8<sup>+</sup> Т-клітин шляхом модифікації рецепторів на їх поверхні, що порушує їх взаємодію з молекулами комплексу гістосумісності класу I на антигенпрезентуючих клітинах. CD8<sup>+</sup> Т-клітини відіграють важливу роль у придушенні пухлини. Експерименти на мишах з нокаутованими системними та мієлоїдними клітинами NRF2 і трансплантованими клітинами карциноми легені Льюїса (3LL) показали більше накопичення ROS у фракції клітин Mac1<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>MDSC, високий рівень захворюваності та меншу тривалість життя [24].

Ці спостереження вказують на те, що активація NRF2 в мієлоїдних клітинах господаря може бути терапевтичною мішенню в клінічних умовах.

Виникненню MDSC сприяють численні фактори, зокрема інтерлейкін-6 (IL-6). Наприклад, було показано, що NRF2 перешкоджає підвищеній експресії прозапальних цитокінів, включаючи IL-6, у макрофагах і що ця функція NRF2 не залежить від рівнів ROS. Отже, здається розумним припустити, що NRF2 відіграє кілька ролей у придушенні MDSC; зокрема, його ефект не залежить від АФК і залежить від репресії IL-6 або залежить від зниження рівня АФК. Крім того, спостерігалось відновлення активності CD8<sup>+</sup> Т-клітин у мікрооточенні з високим рівнем Nrf2, який відображає нижчі рівні маркера імуносупресії програмованого рецептора смерті-1 (PD-1) і вищі рівні маркерів активації Т-клітин. TNF $\alpha$  та IFN $\gamma$  [25].

### **1.5.5. Механізм дії кверцетину на експресію Nrf2**

Кверцетин — це дієтичний флавоноїд, який сприяє здоровій запальній реакції та окислювально-відновному балансу, а також підтримує здоров'я імунітету. Кверцетин є одним із найпоширеніших поліфенолів у рослинах, і його досліджували на різноманітні потенційні переваги для здоров'я, особливо

щодо окислювального стресу та запалення. . Наприклад, систематичний огляд лікування сепсису кверцетином встановив, що він послаблює запалення та окислювальний стрес. Інший систематичний огляд показав, що у суб'єктів із хронічними захворюваннями додавання кверцетину призвело до значного зниження рівня С-реактивного білка. Дослідження також вивчали потенційну дію кверцетину на організм для підтримки антиоксидантного захисту та імунної функції.

Одним із потенційних механізмів впливу кверцетину на організм може бути його активація шляху ядерного фактора-2, пов'язаного з еритроїдним фактором-2 (Nrf2). Nrf2 є невід'ємною частиною антиоксидантного захисту організму. Nrf2 — це фактор транскрипції, який кодує сотні генів, залучених до ключових процесів організму, включаючи окисно-відновний баланс, запалення та детоксикацію. Він також є основним датчиком окисного стресу та модулятором реакції для підтримки пом'якшення будь-якого потенційного збитку від надлишку вільних радикалів. Kelch-подібний ECH-асоційований білок 1 (Keap1) регулює Nrf2, утримуючи його зв'язаним, коли немає окисного стресу, і вивільняючи його під час окисного стресу. Певні дії та сполуки можуть працювати на Keap1 для активації Nrf2. Існують додаткові шляхи, на які можна впливати, щоб увімкнути Nrf2 і активувати антиоксидантний захист організму, який включає пов'язані з глутатіоном ферменти.

Кверцетин може сприяти ядерній транслокації та фосфорилуванню Nrf2, дозволяючи йому активувати транскрипцію ключових генів і подальшу діяльність. Відповідно до одного дослідження клітин, кверцетин може підвищувати фосфорилування Nrf2, опосередковане активацією протеїнкінази С (PKC) та/або інгібуванням глікогенсинтази кінази-3 бета через інгібування p38 мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK). PKC є відомим активатором фосфорилування та сигналізації Nrf2, тоді як шлях кінази p38 є негативним регулятором Nrf2. У дослідженні клітини, оброблені кверцетином, мали підвищену активність шляху Nrf2, що було продемонстровано підвищеними рівнями Nrf2 і підвищеними рівнями гамма-

глутамілцистеїнсинтази та гліоксалази 1, ключового ферменту фази II детоксикації. Обробка клітин інгібіторами РКС або p38 MAPK змінила ефекти кверцетину, продемонструвавши, що ці шляхи кінази потенційно залучені до асоціації кверцетину з Nrf2. Подібним чином інше дослідження клітин показало, що кверцетин призводить до збільшення активності Nrf2 через активність кверцетину на p38 MAPK.

Багато факторів харчування та способу життя підтримують антиоксидантний захист організму та сприяють здоровій запальній реакції. Дієтичні біофлавоноїди, такі як кверцетин, були досліджені, щоб визначити дію, що сприяє зміцненню здоров'я, яку вони можуть надавати як частину здорового харчування. Існують багатообіцяючі дослідження потенціалу кверцетину діяти як активатор шляху Nrf2. Багато рослинних продуктів містять кверцетин, і деякі люди можуть виявити, що додавання цієї фітонутрієнту забезпечує додаткову підтримку окисно-відновного балансу [26].

## **2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ**

У данній роботі використовуються декілька методів на оцінку цитотоксичності та розробляються методи для промислового та лабораторного отримання сировини, що сприяє підвищеній експресії досліджуваного транскрибуючого фактора.

### **2.1. Метод визначення можливої цитотоксичності сировини для отримання потрібної експресії фактору за допомогою лімфоцитів (тест Терасакі)**

Досліджуваний матеріал - гепаринізована цільна кров.

Хто виконує забір крові - медсестра.

Підготовка хворого-забір крові проводиться вранці натще з ліктьової вени в пробірку з внесенням розчином гепарину (0,6 мл), розведеного 1:10.

Дата та години доставки-8.00-10.00.

#### **2.1.1. Діагностична значимість**

Аутоімунними прийнято вважати ті захворювання, в основі яких лежить імунна реакція на власні (аутологічні) антигени тканин та органів. Природні аутоантитіла, що знаходяться в нормі в невеликій кількості, не викликають патологічних процесів, а стимулюють регенерацію тканин. Для імунної аутоагресії необхідно як збільшення їх кількості, а й якісні зміни — посилення антигенної специфічності, підвищення авідності тощо.

#### **2.1.2. Принцип метода**

У сироватці крові присутні антигени, здатні утворювати в присутності комплексу комплекси антиген-комплемент-антитіло, що пошкоджують клітинні мембрани. Клітини пошкодженої клітинною мембраною забарвлюються еозином, а потім метиленовим синім, що дозволяє диференціювати їх від живих, визначаючи таким чином ступінь лімфоцитотоксичності.

### **2.1.3. Реактиви, зразки та обладнання**

1. Розчин фіколу (9,69 г фіколу розчиняють у 132 мл гарячої дистильованої води).
2. Верографін, 76% (ампула 20 мл)
3. Сухий комплемент (вміст ампули розчинити у мл фіз. розчину).
4. Середя 199 або розкращання Рінгера.
5. Розчин зозину 0,1%.
6. Розчин метиленового синього 0,1%.
7. Перманганат калію

### **2.1.4. Приготування робочих розчинів**

#### **2.1.4.1. Приготування градієнтного розчину фіколверографіну**

Змішують фікол і верографін з розрахунку 9,6 г фіколу в 20 мл верографіну і доводять його верографіном до густини 1.077.

#### **2.1.4.2. Приготування робочого розчину барвників**

##### **2.1.4.2.1. Розчин еозину**

1. Приготування маточного розчину еозину 5% із сухого еозину: 5г сухої речовини розчинити в 100г фіз.р-ну.
2. Приготування робочого розчину еозину 0,1% з маткового: розвести матковий розчин 1:19 (20 разів).

##### **2.1.4.2.2. Розчин метиленового синього**

1. Приготування робочого розчину із сухого метиленового синього:
2. 1 г сухої речовини розчинити в 75 мл фіз р-ну.
3. 1,5 г перманганату калію розчинити в 75 мл фіз.р-ну.
4. Прогріти розчини до 60 ° с на водяній бані
5. Влити розчин перманганату калію у розчин метиленового синього.
6. Варити суміш при 50-60°з 1,5-2,0 години.
7. Отриманий розчин профільтрувати за допомогою фільтрувального паперу.

### 2.1.5. Проведення аналізу

1. Розвести гепаринізовану кров 1:1 ЗФР у пробірці,
2. Нашарувати отриманий біоматеріал на 2 мл розчину фіколл-верографін у центрифужній пробірці.
3. Центрифугувати пробірки 25 хв при режимі 1500 об/хв.
4. Злити надосадову рідину (НОЖ).
5. Відібрати «лімфоцитарне кільце», що утворилося, з верхнього кордону пастерівською піпеткою і перенесення в чисту центрифужну пробірку.
6. До виділеної суспензії лімфоцитів додати 6-7 мл ЗФР, ретельно перемішати.
7. Центрифугувати пробірки 10 хв при режимі 1000 - 1500 об/хв.
8. Злити НОЖ
9. Додати до осаду 6-7 мл ЗФР.
10. Центрифугувати пробірки 5 хв при режимі 1000 - 1500 об/хв.
11. З отриманого матеріалу для приготування препарату використовують завись лімфоцитів, яка містить  $2 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл (підрахунок проводиться в камері Горяєва).
12. Провести пробу життєздатність лімфоцитів. Число живих клітин повинне становити не менше 95-98%.
13. У центрифужні пробірки внести 0,1 мл суспензії лімфоцитів (виділених у градієнті щільності фіколл-верографіна), додати по 0,1 мл мл сироватки і інкубувати в термостаті протягом 30 хвилин при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ .
14. У всі пробірки додати краплі розчину комплементу і інкубувати пробірки протягом 1,5 - 2 годин у термостаті при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ .
15. У всі пробірки додати по 1 краплі еозину та інкубувати 10 хвилин.
16. У всі пробірки додати по 2 краплі азур-зозину та інкубувати 1 годину.

### **2.1.6. Облік результатів**

Результати враховують шляхом підрахунку живих та мертвих клітин під світловим мікроскопом. Про лімфоцитотоксичність судять за відсотковим співвідношенням мертвих лімфоцитів (мертві лімфоцити забарвлюються) до загального числа лімфоцитів. Вважають 100 клітин, з них визначають відсоток пошкоджених та живих. Реєструють відсоток ушкоджених (мертвих) клітин.

### **2.1.7. Засоби виміру та обладнання**

#### **2.1.7.1. Засоби виміру**

1. Ваги аналітичні
2. Годинник процедурний
3. Дозатори на 0,05 мл та 0,1 мл
4. Ареометр

#### **2.1.7.2. Додаткове обладнання**

1. Центрифуга
2. Термостат
3. Світловий мікроскоп
4. Лічильник формених елементів крові

#### **2.1.7.3. Посуд**

1. Циліндр мірний на 100 мл
2. Циліндр мірний на 25 мл
3. Додатковий посуд.
4. Пробірки центрифужні
5. Склянки хімічні
6. Скло предметне
7. Скло покривне

### **2.1.8. Контроль якості методу**

Для контролю відтворюваності результатів досліджень використовується метод побудови R-карт (карт розмаху).

Для контролю якості відтворюваності методики щодня з досліджуваними пробами (мазки) пацієнтів готують паралельні препарати одного з досліджуваних хворих у паралелях. Паралельна проба обробляється як досвідчена. За результатами повторних визначень паралельних проб протягом не менше 20 днів робимо побудову контрольної карти. Отримані значення піддають статистичного аналізу за розробленою схемою. Дані статаналізу заносять до таблиці. Будують карти розмаху, відкладаючи на осі абсцис дні досліджень, але в осі ординат - значення величини розмаху.

Для здійснення міжлабораторного контролю за якістю клініко-діагностичних досліджень можуть бути використані сироватки довільно взятих пацієнтів.

### **2.1.9. Можливі помилки**

1. При взятті крові: порушення процедури забору крові;
2. При постановці методу: досить чистий посуд; використання старих чи неправильно приготовлених реактивів; погане фарбування препарату [27].

## **2.2. Метод оцінки інтегральної цитотоксичності сировини для отримання потрібної експресії фактору за допомогою клітинного біосенсора *Dunaliella viridis***

### **2.2.1. Діагностична значимість**

Цитологічні компоненти, що утворюються в організмі під дією різних несприятливих екзогенних та ендогенних факторів, можуть призводити до змін у системі гомеостазу організму. Класифікація станів, що характеризують форму та стадії патології, заснована на дискретній стандартизації цих категорій. Сукупність патогенетичних сироваткових факторів, що з'являються при розвитку різних типів патологій, викликає мембранотропний цитотоксичний ефект. Діагностична задача методу зводиться до виявлення

сукупності сигнальних маркерів, що мають цитотоксичну дію, за допомогою їх інтегральної біологічної дії.

Клітинний біосенсор на основі одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* дозволяє визначити наявність цитотоксичних сироваткових факторів, оцінити розвиток аутоімунних реакцій за допомогою низького порогу чутливості до цитотоксичних сполук, що утворюються.

### **2.2.2. Принцип метода**

Для оцінки цитотоксичності до лунок планшета вносять клітинний біосенсор і досліджувану сироватку крові пацієнта. Після інкубації проводять підрахунок клітин із зміненими морфо-функціональними властивостями (зміна форми клітин, втрата рухливості, утворення агрегатів, виділення екзометаболіту) та порівнюють контрольною культурою.

### **2.2.3. Реактиви, зразки та обладнання**

#### **2.2.3.1. Реактиви**

1. Синхронізована культура одноклітинних водоростей *Dunaliella viridis* віком 18-21 день.
2. Поживне сольове середовище Артарі.

#### **2.2.3.2. Обладнання**

1. Мікроскопи (x200, x400)
2. Камери Горяєва
3. Центрифуга на 3000 об/хв
4. Лабораторний посуд
5. Імунологічний планшет
6. Дозатор 50 мкл.

#### **2.2.3.3. Зразки**

Досліджуваний матеріал – сироватка крові.

#### 2.2.4. Приготування робочих розчинів

Приготування середовища Артарі (Масюк Н. П., 1973):

NaCl – 116 г/л;

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O – 50 г/л;

KNO<sub>3</sub> – 2,5 г/л;

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,2 г/л.

Підготовка суспензії одноклітинної водорості з концентрацією  $2 \cdot 10^4$  клітин/мл.

1. До 0,5 мл культури долити 0,5 мл буфера.
2. Центрифугувати 10 хв при 3000 об/хв.
3. Зняти надосадову рідину.

Отримати осад клітин і при необхідності розбавити його до  $15 \cdot 10^4$  клітин/мл.

#### 2.2.5. Проведення аналізу

1. У лунки імунологічного одноразового планшета внести по 50 мкл тест-системи (для контрольної нативної проби та досліджуваних сироваткових зразків).
2. У першу лунку додати 50 мкл буфера (для визначення коефіцієнта спонтанної цитотоксичності).
3. До другої лунки додати 50 мкл сироватки крові пацієнта.
4. Після 30-хвилинної спільної інкубації клітин *Dunaliella viridis* з буфером у першій лунці підраховують відсоток клітин із зміненими морфологічними, функціональними параметрами, кількість агрегованих клітин.

#### 2.2.6. Облік результатів

Оцінку цитотоксичних факторів роблять за характером зміни морфології клітин (форма, розміри), ступеня рухливості, здатності до утворення

клітинних мікро- та макро-агрегатів (клітинних пальмел) та наявності або відсутності вуглеводної капсули. Для цього проводять мікроскопування препаратів на світловому мікроскопі зі збільшенням 400 крат.

За формулою (1) розраховують сумарний коефіцієнт спонтанної цитотоксичності ( $K_{сп}$ ):

$$K_{сп} = \frac{M_k + \Phi_k + A_k}{3} \quad (1),$$

де  $M_k$  - відсоток клітин зі зміненою формою в контрольній тест-системі,  $\Phi_k$  - відсоток клітин зі зміненими функціональними властивостями в контрольній тест-системі,  $A_k$  — відсоток агрегованих клітин у контрольній тест-системі.

Другий зразок (вміст другої лунки, яка містить сироватку хворого та клітинну тест-систему) оцінюють за морфологічними та функціональними характеристиками та наявністю агрегатів клітин *Dunaliella viridis* та за формулою (2) розраховують коефіцієнт цитотоксичності сироватки ( $K_{цс}$ ) пацієнта:

$$K_{цс} = \left( \frac{M_e + \Phi_e + A_e}{3} - K_{сп} \right) \cdot \frac{1}{K_{сп}} \quad (2),$$

де  $M_e$  — відсоток клітин із зміненою формою в експерименті,  $\Phi_e$  — відсоток клітин зміненими функціональними властивостями в експерименті,  $A_e$  — відсоток агрегованих клітин в експерименті,  $K_{цс}$  — коефіцієнт спонтанної цитотоксичності.

$$I_{ц} = \frac{K_{цс}}{K_{сп}} \quad (3)$$

### 2.2.7. Референтні величини

Для видачі висновку необхідно порівняти між собою спонтанний рівень цитотоксичності ( $K_i$ ) та індукований рівень цитотоксичності під дією сироватки крові пацієнта,

$$K_{цс} \leq K_{сп}.$$

$$I_{ц} \leq 1,0.$$

### **2.2.8. Діагностичні характеристики**

Різке зростання показників цитотоксичності (коефіцієнт індукованої цитотоксичності, інтегральний індекс цитотоксичності). різних форм і стадій патологічного стану - гострих деструктивних процесів, перехідних оборотних станів та стійких незворотних станів (наприклад, цироз печінки), пухлинні процеси, аутоімунні порушення.

### **2.2.9. Заходи безпеки**

Під час роботи використовувати гумові рукавички, захисні окуляри. Заборонено вживати їжу, курити.

### **2.2.10. Примітки**

Можливі помилки можуть відбуватися:

1. Під час взяття крові: порушення процедури забору крові;
2. При постановці методу: недостатньо чистий посуд; використання старих чи неправильно приготовлених реактивів.

### **2.2.11. Утилізація**

Усі зразки вважаються потенційно інфікованим матеріалом. Тому залишки зразків та реактивів необхідні встановленими правилами [28].

## **2.3. Патентний пошук літератури по методах отримання шляхом екстракції куркуміна та кверцитіна, а також можливих шляхів рекомбінантного впливу на експресію досліджуваного фактору за останні 5 років**

Було знайдено та запропоновано способи оптимізації для методів екстракції куркуміну та кверцетину за допомогою ультразвуку та ферментної обробки. Також була розроблена схема для отримання бажаних цільових продуктів шляхом рекомбінації.

Нижче наведено перелік необхідних матеріалів та методів для кожного способу.

### **2.3.1. Загальний принцип методу екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE)**

Метод екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE) базується на використанні ультразвукових хвиль для розриву структури сировини та полегшення вивільнення цільових сполук у розчинник.

Основний принцип полягає в тому, що ультразвукові хвилі, генеровані ультразвуковим вантажем, створюють високочастотні механічні коливання в розчиннику, що призводять до формування тискових хвиль і місцевих різких змін температури і тиску. Ці ефекти створюються і розсіюються у ванні з сировиною, сприяючи розриванню клітинних стінок, розщепленню твердих часток та вивільненню біологічно активних сполук у розчинник.

Процес екстракції за допомогою ультразвуку може бути підсилений застосуванням розчинників, які мають властивості впливу на структуру матеріалу або підвищують розчинність цільових сполук. Також можна контролювати температуру, що допомагає збільшити розчинність та полегшити екстракцію.

Ультразвукова екстракція має декілька переваг, зокрема вона швидша, більш ефективна та екологічно чиста порівняно з традиційними методами екстракції. Вона дозволяє досягти високої виходу цільових сполук за короткий час, зменшує кількість використаного розчинника та мінімізує ризик деградації сполук під впливом високих температур або хімічних реагентів [29, 30, 31].

### **2.3.2. Обладнання, необхідне для екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE)**

Тут наведено перелік загального обладнання, необхідного для даного методу екстракції.

1. Ультразвуковий вантаж: Це спеціальне пристрій, що випромінює ультразвукові хвилі. Вантаж зазвичай має настройку потужності та регульований таймер для контролю процесу.

2. Ванна для екстракції: Це ємність, в яку поміщається розчинник та сировина для екстракції. Ванна повинна мати відповідні розміри та матеріал, який не впливає на екстракцію сполук.

3. Термостат: Деякі методи екстракції за допомогою ультразвуку вимагають контролю температури. Термостат допомагає підтримувати стабільну температуру в протязі екстракційного процесу.

4. Рефлюксний конденсатор: Це пристрій, що застосовується для охолодження парів розчинника, які утворюються під час ультразвукової екстракції. Конденсатор забезпечує повернення розчинника у ванну для подальшого використання.

5. Змішувальний пристрій: Ультразвукова екстракція може потребувати постійного перемішування сировини та розчинника. Для цього можна використовувати магнітну мішалку або інший змішувальний пристрій.

6. Лабораторний холодильник: Якщо екстракція проводиться при низьких температурах, необхідно мати доступ до лабораторного холодильника для зберігання сировини та розчинника при необхідних умовах.

### **2.3.3. Загальний принцип метода екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (EAE)**

Екстракція кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (EAE) - це метод, який використовує ферментативний розклад для виділення цих сполук з природних джерел, таких як рослини. Основний принцип полягає у використанні ферментів, які взаємодіють з рослинним матеріалом та сприяють вивільненню кверцетину та куркуміну з їх природної матриці.

Основні етапи методу екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів включають наступне:

1. Приготування рослинного матеріалу: Свіжі або сухі частини рослин, що містять кверцетин та куркумін, збираються і піддаються попередній обробці, такі як мелювання або подрібнення, для збільшення поверхні контакту та полегшення доступу ферментів до сполук.

2. Підготовка екстракційного розчину: Ферменти, які використовуються в процесі, розчиняються в певному буфері або розчиннику, що створює оптимальні умови для їх активності. Цей розчин потім додається до рослинного матеріалу.

3. Ферментативна реакція: Рослинний матеріал з ферментативним розчином піддається інкубації або змішується протягом певного часу. Під час цього процесу ферменти розкладають клітинні структури рослини, звільняючи кверцетин та куркумін з їх зв'язаних форм.

4. Розділення екстракту: Після ферментативної реакції екстракт розділяється від нерозстворених рослинних залишків. Це може бути досягнуто шляхом фільтрування, відстоювання або центрифугування. Це дозволяє отримати чистий екстракт, який містить кверцетин та куркумін.

5. Очищення та концентрування екстракту: Отриманий екстракт може підлягати додатковому очищенню для видалення небажаних домішок або забруднень. Це може включати використання методів, таких як хроматографія або фільтрація. Після очищення екстракт може бути концентрований, наприклад, шляхом евапорації розчинника.

6. Аналіз та визначення вмісту кверцетину та куркуміну: Остаточний екстракт піддається аналізу для визначення вмісту кверцетину та куркуміну. Це може бути зроблено за допомогою хімічних методів, таких як спектрофотометрія або хроматографічні техніки, якщо необхідно отримати кількісні дані про концентрацію цих сполук.

7. Загальний принцип методу ЕАЕ полягає в тому, що ферменти взаємодіють з рослинним матеріалом, що містить кверцетин та куркумін, і сприяють їх виділенню. Ферментативний розклад допомагає розривати структури клітин та звільняти ці сполуки з матриці. Після розділення екстракту та його очищення отримують чистіший екстракт, який може бути використаний для подальших досліджень або виробництва [29, 32].

### **2.3.4. Обладнання, необхідне для екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (ЕАЕ)**

Для екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (ЕАЕ)

можна використовувати наступне обладнання:

1. Біореактор: Це контейнер, де відбувається реакція екстракції за допомогою ферментів. Біореактори можуть бути різних типів, наприклад, побутові, лабораторні або промислові, залежно від масштабу процесу.

2. Агітатор: Це пристрій, який забезпечує перемішування реакційної суміші у біореакторі. Агітатори можуть бути механічними (наприклад, магнітними мішалками) або повітряними (за допомогою повітряних бульбашок), що забезпечують рівномірне поширення ферментів із сировиною.

3. Регулятор температури: Деякі ферменти ефективні при певних температурах. Тому для ефективної екстракції за допомогою ферментів може бути необхідний регулятор температури, який дозволяє підтримувати оптимальну температуру протягом процесу.

4. Фільтраційна система: Після екстракції може знадобитися фільтрація для відокремлення екстракту від твердих решток сировини та ферментів. Фільтраційна система може включати фільтри, фільтрувальні колони або центрифуги.

5. Насос: Насоси використовуються для перекачування реакційної суміші в біореакторі та для переміщення екстракту під час фільтрації.

6. Апарат для концентрації: Якщо екстракт потрібно концентрувати, можна використовувати спеціальний апарат для випаровування розчинника або засоби для сушіння, такі як ротаційний випаровувач або ліофілізатор. Це допоможе зменшити об'єм розчинника і збільшити концентрацію цільових сполук.

7. Інкубатор: Деякі ферменти можуть потребувати оптимальних умов для активності. Тому, якщо використовуються ферменти, екстракційний процес може вимагати використання інкубатора, щоб забезпечити необхідну температуру та вологість.

8. Аналітичне обладнання: Для визначення вмісту кверцетину та куркуміну в екстракті можуть знадобитися аналітичні прилади, наприклад, спектрофотометр або хроматографічні системи, які дозволяють кількісно виміряти присутність цільових сполук.

9. Зберігальні пристрої: Після екстракції може знадобитися зберігання екстракту. Тому необхідно мати під рукою контейнери або пляшки для зберігання екстракту при необхідних умовах, щоб зберегти його якість та стабільність.

### **2.3.5. Загальний принцип отримання Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій**

Отримання білка Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій передбачає використання генетично модифікованих мікроорганізмів або клітинних ліній для синтезу цього білка у великій кількості. Загальний принцип процесу отримання Nrf-2 включає наступні кроки:

1. Клонування гену Nrf-2: Спочатку, ген Nrf-2, який кодує білок Nrf-2, ізолюється з джерела, наприклад, з людської ДНК. Потім він вводиться відповідно до методу клонування в рекомбінантний вектор, який може бути використаний для введення гену в мікроорганізми або клітинні лінії.

2. Трансформація мікроорганізмів або клітин: Отриманий рекомбінантний вектор, що містить ген Nrf-2, вводиться до вибраного мікроорганізму або клітинної лінії. Цей процес може виконуватися за допомогою різних методів, таких як трансформація бактерій, трансфекція в клітини дрозофіли, гостріл гену в рослину і т.д.

3. Культивування рекомбінантних мікроорганізмів або клітинних ліній: Після трансформації рекомбінантних організмів або клітин вони культивуються в спеціальних умовах, що сприяють ефективному вираженню та накопиченню білка Nrf-2. Це може включати використання поживних

середовищ, оптимальних температур, контролю рН, аерацію і інші фактори, що сприяють росту та вираженню рекомбінантного білка.

4. Збір і очищення рекомбінантного Nrf-2: Після достатнього накопичення рекомбінантного білка Nrf-2 в культурі мікроорганізмів або клітинній лінії, проводять процес збору клітин або мікроорганізмів. Це може включати збирання культурної рідини, відокремлення клітин або мікроорганізмів шляхом центрифугування або фільтрації.

5. Розрив клітин або лізу мікроорганізмів: Для визволення рекомбінантного Nrf-2 з клітин або мікроорганізмів, проводять процес розриву клітин або лізу, використовуючи різні методи, такі як механічне руйнування, осмотичний тиск, хімічні реагенти або ензими.

6. Очищення білка: Після розриву клітин або лізу мікроорганізмів, проводять процес очищення рекомбінантного Nrf-2 від інших компонентів, таких як рибонуклеази, дезоксирибонуклеази, ліпіди, полісахариди та інші забруднення. Для цього використовуються методи хроматографії, такі як афінна хроматографія, оберտальна хроматографія, іонообмінна хроматографія та інші.

7. Аналіз і стабілізація: Після очищення проводять аналіз рекомбінантного Nrf-2, щоб оцінити його чистоту, активність та концентрацію. Після цього може бути проведений процес стабілізації, який включає зберігання білка за оптимальних умов для забезпечення його довготривалої стабільності та активності [33, 34].

### **2.3.6. Обладнання, необхідне для отримання Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій**

Отримання Nrf-2 за допомогою рекомбінантних технологій вимагає використання певного обладнання. Основними етапами цього процесу є клонування гена Nrf-2, його вираження у рекомбінантних організмах та очищення отриманого білка. Для цього можуть бути використані наступні види обладнання:

Лабораторне обладнання для клонування та маніпуляцій з ДНК:

- Термоциклер: використовується для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), необхідної для ампліфікації гена Nrf-2.
- Електрофоретична установка: використовується для розділення ДНК на гель-електрофорезі для аналізу та виділення фрагментів ДНК.

Біореактори для вираження рекомбінантного білка:

- Ферментер: великомасштабна система, що забезпечує оптимальні умови для росту та вираження рекомбінантних організмів, таких як бактерії або дріжджі.
- Інкубатор: використовується для забезпечення оптимальної температури, вологості та аерації для культивування рекомбінантних клітин.
- Біохроматограф: може використовуватись для очищення рекомбінантного білка Nrf-2 з біологічної суміші.

Лабораторне обладнання для аналізу та очищення білків:

- Спектрофотометр: використовується для вимірювання оптичних властивостей білків, таких як абсорбція і флуоресценція, для аналізу концентрації та чистоти отриманого Nrf-2.
- Хроматограф: може використовуватися для розділення та очищення рекомбінантного білка Nrf-2.

Додатково до обладнання, необхідного для вищезгаданих кроків, також потрібні:

Центрифуга: використовується для розділення клітинних компонентів та отримання рекомбінантного білка з клітинної супутності.

Спектрофотометр або флуориметр: для кількісного аналізу концентрації білка та визначення його чистоти.

Електрофорезний блок: для аналізу та перевірки розмірів та чистоти отриманого Nrf-2.

Усе це обладнання допомагає провести ефективну і чисту рекомбінантну продукцію білка Nrf-2, що в подальшому може бути використано для досліджень, лікарських цілей або інших додаткових досліджень.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ

#### 3.1. Метод екстракції кверцетину та куркуміну

Кверцетин QUR – це фітохімічна речовина, яка має корисні властивості для здоров'я проти різних захворювань. Однак деякі дослідження довели його погану засвоюваність в організмі людини. Нещодавно були запропоновані інноваційні стратегії, які підвищують біоактивність QUR у людей, знижують витрати та краще описуються під час клінічних обстежень. Дослідники також розробили нові методи екстракції які забезпечують кращий вихід екстракції QUR. Крім того, майбутня робота може бути зосереджена на мінімізації обмежень вищезгаданих методів, і інтеграція одного або кількох методів екстракції також є варіантом для покращення результатів. Звичайні методи екстракції, такі як мацерація, Соклет, гідродистиляція та екстракція з зворотним холодильником, використовувалися протягом десятиліть для екстракції флавоноїдів. Однак методи вимагають тривалого часу обробки, високих температур, включають більше розчинників, лише навчений персонал може працювати з обладнанням, екологічно небезпечні, а системи є економічно неефективними. Тому, щоб подолати ці недоліки, було розроблено й успішно застосовано кілька альтернативних нових методів екстракції для екстракції QUR.

Ці методи включають екстракцію за допомогою ультразвуку (UAE), екстракцію за допомогою мікрохвиль (MWAE), надкритичну рідинуекстракція (SFE) та екстракція за допомогою ферментів (EAE). Кожна техніка має унікальний механізм для покращення вилучення, а також принципи та параметри обробки. Нові підходи до екстракції сприяють скороченню часу екстракції, використовують менше органічних розчинників і є екологічно чистими [29].

### **3.1.1. Метод екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ультразвуку (UAE)**

Добування кверцетину пропонується проводити під ультразвуковою обробкою з використанням ванни для ультразвукового очищення, Bransonic Ultrasonic Corporation; модель № 5510E-DTH (частотою 42 кГц і номінальною потужністю 135 Вт). 2 г точно зваженої свіжої капусти дрібно нарізати та змішати з 20 мл суміші метанол: вода (40:60, 60:40, 80:20 об.:об.). Суміш гомогенізували у високошвидкісному блендері протягом 1 хв і перенесли в колбу на 50 мл. Кверцетин, присутній у зразку, екстрагували протягом різних інтервалів часу, тобто 20, 30 і 40 хвилин, в ультразвуковій ванні при 30 °С. Зразок потрібно охолодити і центрифугувати при 5000 об/хв протягом 10 хв. Цю процедуру повторити двічі, і зібрані супернатанти зберігати для подальшого аналізу кверцетина. Аналогічна схема екстракції пропонується для куркуміну.

Очікуваний вихід продукції - 1378,9 мкг/мл [30, 31].

### **3.1.2. Метод екстракції кверцетину та куркуміну за допомогою ферментів (EAE)**

#### **3.1.2.1 Загальний принцип методу екстракції гарячою водою та методу ферментативного гідролізу**

Новий екологічно безпечний метод безперервної екстракції гарячою водою та метод ферментативного гідролізу для визначення кверцетину в сировині цибулі було успішно розроблено з використанням підходу поетапної оптимізації. На першому етапі ферментативний гідроліз кверцетин-3,4'-диглюкозиду до кверцетину був оптимізований за допомогою трирівневої центральної композитної конструкції з урахуванням температури (75–95 °С), рН (3–6) та об'ємної концентрації етанолу (5 –15%). Використаний фермент був термостабільним варіантом  $\beta$ -глюкозидази, ковалентно іммобілізованим на одному з двох акрилових матеріалів-підкладок (Eupergit® С 250L або монолітний криогель). Оптимальні умови реакції були незалежно від опори 84 °С, 5% етанолу та рН 5,5, і за цих умов не спостерігалось значної втрати

активності ферменту протягом 72 годин використання. На другому етапі гаряча водна екстракція з нарізаної жовтої цибулі, яка проводилася при оптимальній для гідролізу температурі, була оптимізована у дворівневому дизайні щодо рН (2,6 і 5,5), концентрації етанолу (0 і 5%) і швидкості потоку (1 і 3 мл хв<sup>-1</sup>). Отримані результати показали, що загальний вихід кверцетину був у 1,7 рази вищим при швидкості потоку 3 мл хв<sup>-1</sup> (час екстракції 90 хв), порівняно зі швидкістю потоку 1 мл хв<sup>-1</sup> ( час екстракції 240 хв). Присутність 5% етанолу була сприятливою для виходу екстракції, тоді як подальше зниження рН не сприяло, навіть на одній стадії екстракції. Нарешті, метод повного безперервного потоку (84 °С, 5% етанол, рН 5,5, 3 мл / хв ) використовувався для екстракції кверцетину з жовтої, червоної цибулі та цибулі-шалот, що призвело до вищого або подібного виходу ( *наприклад* ,  $8,4 \pm 0,7$  мкмоль ). г<sup>-1</sup> свіжої ваги жовтої цибулі) у порівнянні зі звичайним методом періодичної екстракції з використанням метанолу як екстракційного розчинника.

Оптимальні умови для гідролізу, швидше за все, відрізнятимуться від тих, що максимізують екстракцію, і оскільки фермент більш чутливий до змін навколишнього середовища, спочатку були оптимізовані умови гідролізу. Оптимізацію було проведено, щоб налаштувати температуру, рН і концентрацію розчинника до умов, за яких була отримана стабільна активність ферменту, яка, за прогнозами, встановила межу для комбінованої екстракції та гідролізу. Таким чином, швидкість екстракції в комбінованій системі може бути повільнішою, ніж у періодичному процесі з окремими етапами, оскільки температура екстракції регулюється відповідно до активності та стабільності ферменту. Вплив часу (швидкість потоку та адсорбції), а також температури на стабільність і вихід аналіту (кверцетину) обговорюється нижче [35, 36].

### 3.1.2.2. Оптимізація температури, рН і процентного вмісту етанолу в гідролізній частині системи

Оптимальні умови для гідролізу, швидше за все, відрізнятимуться від тих, що максимізують екстракцію, і оскільки фермент більш чутливий до змін навколишнього середовища, спочатку були оптимізовані умови гідролізу. Оптимізацію було проведено, щоб налаштувати температуру, рН і концентрацію розчинника до умов, за яких була отримана стабільна активність ферменту, яка, за прогнозами, встановила межу для комбінованої екстракції та гідролізу. Таким чином, швидкість екстракції в комбінованій системі може бути повільнішою, ніж у періодичному процесі з окремими етапами, оскільки температура екстракції регулюється відповідно до активності та стабільності ферменту. Вплив часу (швидкість потоку та адсорбції), а також температури на стабільність і вихід аналіту (кверцетину) обговорюється нижче.

Для оптимізації гідролізу використовували стандартний розчин Q-3, використовували три параметри, рН (3–6), температуру (75–95 °C) і об'ємну концентрацію етанолу (5–15%), для ферментів, іммобілізованих на двох акрилових матеріалах, Eupergit® C і кріогелі.

Eupergit® C — це кульки з меншим певним розміром пор, які є комерційно доступними. Кріогель — це монолітний матеріал із великими порами, що може бути сприятливим, якщо потрібні вищі швидкості потоку та якщо зразок не настільки чистий, що містить великі частки та сміття. Однак іммобілізаційна здатність цього матеріалу нижча, що є недоліком.

Таким чином, для покращення розчинності кверцетину додавали етанол для мінімізації втрат екстрагованого аналіту.

Найвищий вихід гідролізу був отриманий при найнижчому протестованому відсотковому вмісті етанолу, при рН між 5 і 6 і при температурах в діапазоні 80–85 °C для ферменту, іммобілізованого на обох матеріалах носіїв. Розраховано, що оптимізовані умови для гідролізу становлять 84 °C і 5 об.% етанолу для ферментів, іммобілізованих на обох опорних матеріалах, у той час як оптимальний рН усереднюється до рН 5,5.

Вихід кверцетину становив 12,56 мкг/г. [35, 36].

### 3.2. Метод отримання *Nrf-2* за допомогою рекомбінантних технологій

#### 3.2.1. Вибір продуцента

Кишкова паличка (лат. *Escherichia coli*, Теодора Ешерихії ) - грам паличкоподібна бактерія , широко зустрічається в нижній частині кишечника теплокровних організмів . Більшість штамів *E. coli* є нешкідливими, проте серотип O157: H7 може викликати важкі харчові отруєння у людей. Нешкідливі штами є частиною нормальної флори кишечника людини і тварин. Кишкова паличка приносить користь організму хазяїна, наприклад, синтезуючи вітамін К, а також запобігаючи розвитку патогенних мікроорганізмів у кишечнику.

Кишкову паличку вважають універсальним організмом для синтезу чужорідних білків. У *E. coli* дослідники вводять гени за допомогою плазмід, що дозволяє здійснювати біосинтез білків для промислової ферментації. Також розроблені системи для синтезу в *E. coli* рекомбінантних білків. Одним з перших прикладів використання технології рекомбінантних ДНК є синтез аналога інсуліну людини. Модифіковані *E. coli* використовують при розробці вакцин, синтезу іммобілізованих ферментів і вирішення інших завдань. Однак, в організмі *E. coli* неможливо отримувати деякі великі білкові комплекси, що містять дисульфідні зв'язку, зокрема, білки, для прояву біологічної активності яких потрібна посттрансляційна модифікація [37].

Загалом, отримання *Nrf-2* за допомогою рекомбінантних технологій може включати наступні кроки:

1. Клонування гену, який кодує білок *Nrf-2* в експресійний вектор.
2. Трансформація рекомбінантного вектора в бактерії або інші виразні системи, такі як дріжджі або комахи.
3. Експресія рекомбінантного білка та його очищення.

4. Отримання *Nrf-2* з очищеного рекомбінантного білка за допомогою хімічних або біохімічних методів (рис. 5) [34].

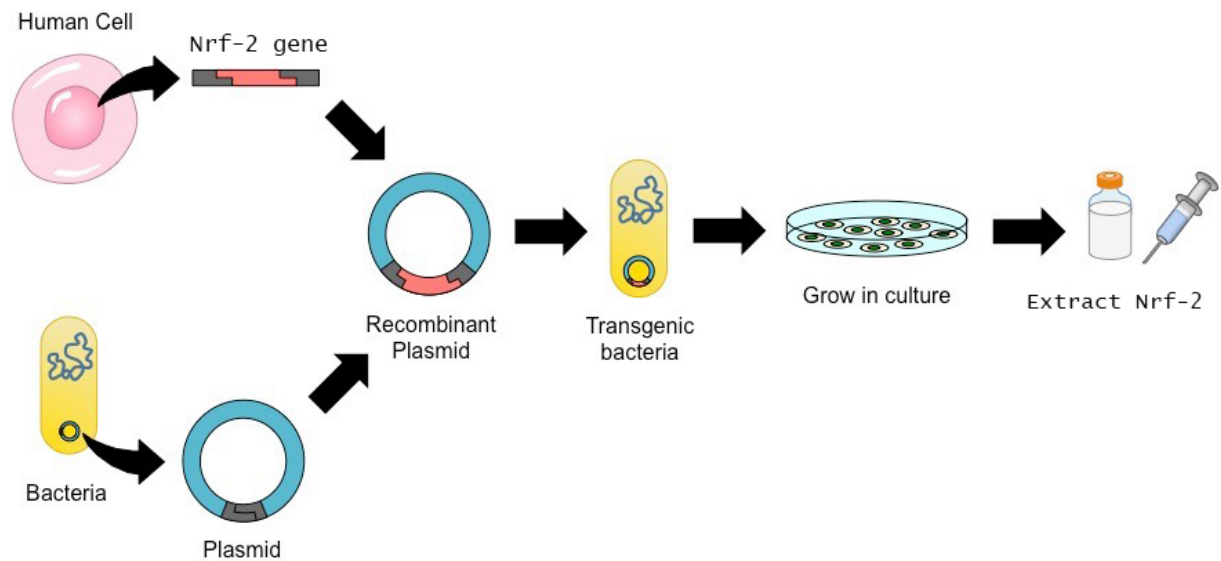


Рисунок 5. Загальна схема рекомбінації.

Далі про кожен з цих кроків в подробицях.

### 3.2.2. Клонування гену, що кодує білок з *Nrf-2*, в експресійний вектор

Процес клонування гену, що кодує білок з *Nrf-2*, в експресійний вектор складається з кількох кроків:

1. Отримання ДНК-шаблону: спочатку потрібно отримати ДНК-шаблон, що містить ген, який кодує білок з *Nrf-2*. Це можна зробити, наприклад, шляхом виділення ДНК з клітин, що містять білок з *Nrf-2*, або з синтетичної ДНК.

2. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): ДНК-шаблон піддається ПЛР, що дозволяє отримати багатокопійкову кількість фрагментів ДНК з геном, що кодує білок з *Nrf-2*.

3. Обробка ферментами рестрикції: отримані фрагменти ДНК піддаються обробці ферментами рестрикції, які розрізають ДНК на певних послідовностях нуклеотидів. Це дозволяє отримати фрагменти ДНК зі зрізаними кінцями, які можуть бути вставлені в експресійний вектор.

4. Лігація ДНК-фрагментів з вектором: зрізані кінці фрагментів ДНК з геном, що кодує білок з *Nrf-2*, можна лігувати з вектором, що містить промотор, регуляторні послідовності та мітки, необхідні для експресії та очікуваного приділення білка. Лігацію можна здійснити за допомогою ферментів лігази.

5. Трансформація в бактерії: після лігації отримані конструкти необхідно трансформувати в бактерії, наприклад, в штам *E. coli* [34].

### 3.2.3. Отримання та конструювання вектору

Вектор pET28b (EMD, Gibbstown, NJ) модифікували наступним чином. Мітку His6 і послідовність розщеплення тромбіну вирізали рестриктазами NcoI і NdeI і замінили такою послідовністю ДНК: CATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACA GCAGCGCGAAAACCTGTACTTCCAGGGCAGCTATGGCCGTAAAAAACG TCGTCAGCGTCGTCGCTATCCGTATGATGTGCCGGATGTGGCGGGCGGC AGCCA. Новий вектор, pET28b-TEVTAT, містив послідовність для N-кінцевої мітки, що складається з мітки His6, сайту розщеплення протеазою TEV (ENLYFQGS), домену трансдукції білка TAT послідовність (YGRKKRRQRRR) і тег HA (YPYDVPDVA). Послідовність для мишачого Nrf2, що міститься у векторі pEF, була ампліфікована за допомогою ПЛР і лігована в pET28b (Nrf2) і в pET28b-TEVTAT (TAT-Nrf2) вектор з використанням сайту рестрикції NdeI. Послідовність посиленого зеленого флуоресцентного білка (EGFP), знайденого у векторі ретровірусу p3051, була ампліфікована за допомогою ПЛР і лігували в pET28b-TEVTAT (TAT-EGFP) [38].

Можна розглянути інший варіант конструювання вектору з мезенхімальних клітин.

Рекомбінантні аденовіруси були отримані за допомогою вектора Gateway pAd/CMV/V5-DEST і ViraPower Adenoviral. Expression System (Invitrogen), відповідно до інструкцій виробника. Як джерело гена Nrf2

використовували виділені з кісткового мозку МСК. Клітини культивували в 25 см<sup>2</sup> колби для культури клітин і вирощували в DMEM-LG (Gibco, США) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (FBS; Invitrogen, США) 100 ОД пеніциліну/мл і 100 мг стрептоміцину/мл (Sigma, США) у зволоженій камері. атмосфера 5% CO<sub>2</sub> і 95% повітря при 37°C. Щоб індукувати експресію Nrf2, МСК опромінювали УФ протягом 1 години, а потім екстрагували РНК за допомогою комерційного набору згідно з протоколами виробника (Invitrogen, Карлсбад, Каліфорнія, США). Повнорозмірні кДНК Nrf2 були ампліфіковані RT-PCR з використанням специфічного прямого 5'-CACCATGGGAATGGACTTGGAGCTGCC-3' і зворотний 5'-CTAGTTT.

Праймери TTCTTAACATCTGGCTTCTTAC-3'. Ампліфікований фрагмент кДНК клонували у вектор pENTER/TEV/DTOPO за допомогою набору для клонування pENTER Directional TOPO (Invitrogen). Точність кодуючої послідовності Nrf2 у векторі pENTER/TEV/D-TOPO була підтверджена секвенуванням ДНК. Нарешті, касету експресії Nrf2 перенесли з вектора шлюзу pENTR до плазмиди експресії аденовірусу pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen Life Technologies) шляхом гомологічної рекомбінації за допомогою LR-клонази II.

Щоб отримати вірусні частинки, плазмиди pAd/CMV, що несуть потрібний ген, лінеаризували ендонуклеазою рестрикції PacI і змішали з Lipofectamine 2000 (Invitrogen) у середовищі Opti-MEM (Invitrogen) і трансфікували в субконфлюентні клітини 293А (субклон 293 клітинна лінія). Потім клітини 293А культивували в середовищі DMEM-HG (Gibco, США), що містило 10% фетальної телячої сироватки, і M. Mohammadzadeh et al. середовище замінювали кожні 2 дні до 80% клітин відокремлені від тарілок. Вірусні частинки збирали з трьома циклами заморожування/розморожування з подальшим центрифугуванням при 1750×g протягом 15 хв. Щоб посилити вірусний титр, клітинні лізати додавали до свіжих клітин 293А та культивували протягом кількох днів, поки всі клітини не від'єднаються. Після

трьох послідовних раундів ампліфікації зібране середовище, що містить аденовірус, використовували як запас вірусу.

Кількість вірусних частинок (VP) визначали методом кінцевого розведення. Множинність інфекції визначали як відношення загальної кількості бляшкоутворюючих одиниць до загальної кількості клітин, які були інфіковані. В якості контролю вектор pAd/CMV/V5-GW/lacZ (Invitrogen) розщеплювали PacI і трансфікували в клітини 293A для отримання аденовірусів, що містять lacZ. Аліквоти середовища, що містить аденовірус, додавали до клітин для наступних аналізів [33].

#### **3.2.4. Трансформація рекомбінантного вектора в продукуючу систему, таку як E. coli. або МСК**

МСК опромінювали УФ протягом 1 години, щоб індукувати експресію Nrf2. Потім виконується ампліфікація кДНК Nrf2 з використанням специфічних праймерів і повної клітинної РНК як матриці, що призводить до отримання єдиної смуги приблизно 1825 п.н. на електрофорезі в агарозному гелі. Продукт ПЛР спрямований на клонування у pENTR/D-TOPO, який є донорним вектором для рекомбінаційного клонування Gateway. ПЛР-аналіз екстрагованої рекомбінантної плазмиди підтвердив клонування послідовності, що кодує Nrf2, у вектор pENTR/D-TOPO. Потім точність клонованої послідовності була підтверджена секвенуванням (номер доступу в GenBank NM446346). Нарешті, була проведена реакція рекомбінації LR, і правильна рекомбінація була підтверджена [33].

#### **3.2.5. Експресія рекомбінантного білка в E. coli**

TAT-Nrf2 експресувався в модифікованому векторі pET28b, призначеному для включення мітки His6, сайту розщеплення протеазою TEV, мітки трансдукції білка TAT і мітки HA на N-кінці білка Nrf2. Послідовності, що кодують Ser і Gly, були додані в ключових місцях, щоб додати гнучкості та уникнути можливих проблем із доступністю протеази через стеричні

перешкоди в отриманому поліпептидному ланцюзі. TAT-Nrf2 (72 кДа) експресували в штаммах *E. coli* BL21(DE3)pLysS або Rosetta2(DE3)pLysS. Останній штам містить додаткові tРНК, що кодують рідкісні кодони *E. coli*, що призводить до значно кращої експресії TAT-Nrf2. Білок TAT-Nrf2 експресували у вигляді нерозчинних тілець включення; розчинна фракція містила незначну кількість білка TAT-Nrf2, який не піддавався очищенню. Ізольовані тільця включення містили велику кількість забруднень, можливо, через передчасну трансляцію–термінацію. Одним із забруднень тільця включення є білок приблизно 38 кДа, його кількість була обернено пропорційна кількості TAT-Nrf2. Швидше за все, це був ендогенний білок *E. coli*, експресія якого також була індукована паралельно невідомим механізмом [39].

Якщо ж говорити про експресію в МСК, то спостерігалася транзиторна експресія Nrf2 у МСК з використанням аденовірусного вектора.

Четвертий пасаж МСК був інфікований відповідною множинністю інфекції (MOI) рекомбінантного аденовірусного вектора, що містить послідовність, що кодує Nrf2 (Ad-hNrf2), або контрольного вірусного вектора (Ad-V). RT-PCR використовували для порівняння змін експресії Nrf2 у різні моменти часу (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 та 14 днів після інфікування). Початкова експресія Nrf2 була виявлена на 2-й день і зросла до найвищого рівня експресії на 6-й день, потім вона знизилася, і на 14-й день експресія не була виявлена. Відповідно, найвищий рівень експресії білка Nrf2 також був виявлений вестерн-блоттингом на 6-й день. Багато спроб не змогли виявити експресований білок Nrf2 в інші дні за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням методу фарбування DAB.

Ці результати свідчать про тимчасову надмірну експресію Nrf2. Більшість трансдукованих МСК безперервно прилипали до чашок для культури тканин, і жодних чітких морфологічних змін не спостерігалось [33].

### 3.2.6. Очищення рекомбінантного білка за допомогою хроматографії

Усі хроматографічні розділення проводили при кімнатній температурі на системі АКТА Purifier HPLC (GE Healthcare, Piscataway, NJ), обладнаній зондом провідності, УФ/видимим детектором і колектором фракцій Frac950. Для очищення на основі His-tag використовували 5-мл хелатну колонку HiTrap Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare). Використовували дві колонки ексклюзійної хроматографії (SEC) різного розміру:

Колонка Shodex Protein KW802.5 (Showa Denko America Inc., Нью-Йорк, Нью-Йорк) для аналітичної SEC і колонка Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare) для очищення SEC в умовах денатурації.

Хроматографію гідрофобної взаємодії (HIC) проводили на 1-мл колонці Phenyl-Sepharose FF (низьке заміщення) (GE Healthcare).

Для очищення білка TAT-Nrf2 не використовували етап ІМАС, оскільки мітка His<sub>6</sub> на N-кінці полегшує спільне очищення скорочень разом з повною довжиною білка. Оскільки ДНК-зв'язуючий домен Nrf2 розташований на C-кінцевому кінці білка, спільно очищені скорочення можуть бути неактивні для активації транскрипції гена, що залежить від ARE. Для відділення повної довжини TAT-Nrf2 від скорочень використовували SEC в умовах денатурації. Тільця включення були розчинені в 6 М GdnHCl і після хроматографування на колонці Superose 6 10/300 у буфері з 3 М GdnHCl, повнорозмірний білок TAT-Nrf2 було відділено від менших забруднюючих білків, які були відокремлені від TAT-Nrf2 у фракціях F11-F15. Також виявлено невелику кількість нуклеїнових кислот у фракціях F4-F8. Очищення від забруднень дозволило уникнути необхідності в подальшому очищенні. Більшість TAT-Nrf2 було елюйовано в фракції F10, але деяка кількість білка була виявлена в фракціях F9, F11 і F12. В процесі SDS-PAGE, для кращої видимості, було завантажено шість разів менше зразка у вхідній доріжці порівняно з елюйованими фракціями

Узагальнена схема експресії та очищення білка Tat-Nrf2 показана на рисунку 6 [39].

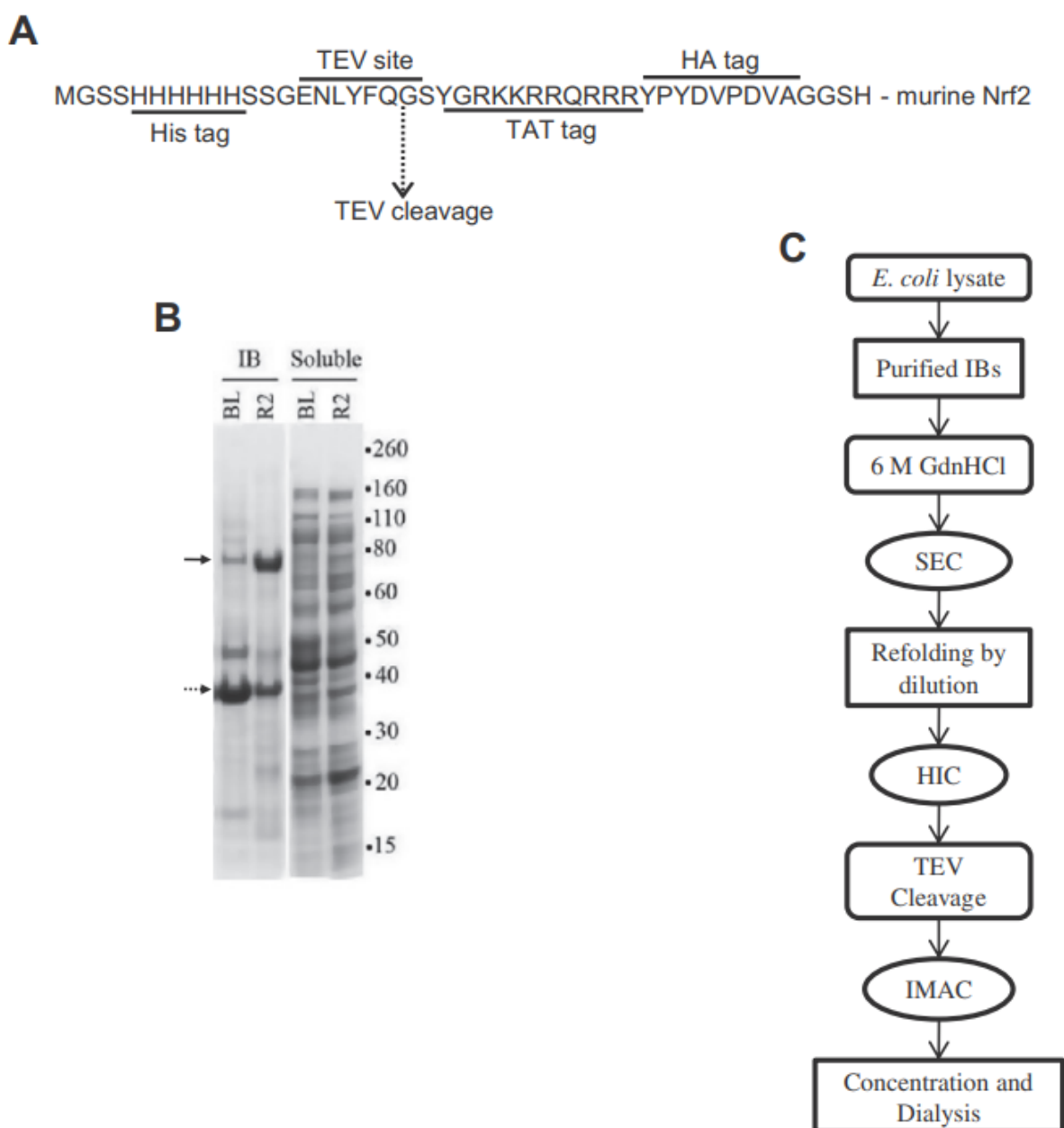


Рисунок 6. Експресія та очищення білка Tat-Nrf2. (А) Послідовність мишачого Nrf2, клонованого в модифікований вектор pET28b, який містить N-кінцеву мітку 6His, сайт розщеплення протеазою TEV, мітку TAT і мітку HA. (В) Експресія TAT-Nrf2 у штаммах *E. coli* BL21(DE3)pLysS [BL] і Rosetta 2(DE3)pLys [R2]. Суцільна стрілка вказує білок TAT-Nrf2 (72 кДа). Пунктирна стрілка вказує на невідомий ендогенний білковий контамінант *E. coli* (38 кДа). (С) План очищення TAT-Nrf2, виділеного з тілець включення *E. coli*.

### **3.2.7. Форма отриманого продукту**

Кінцевий продукт - *Nrf-2* в чистій формі.

Кінцевий продукт буде у формі рідини. У фосфатно-буферному фізіологічному розчині (рН 7,4), що містить 10% гліцерину. Концентрація очікуваного продукту 0,25 мг/мл [39, 40].

### **3.2.8. Умови подальшого зберігання та використання**

Можна зберігати при температурі від 2 до 8 °С протягом 1 тижня. Для тривалого зберігання розберіть аликвоти та зберігайте при температурі від -20°С до -80°С. Уникайте повторних циклів заморожування та відтавання.

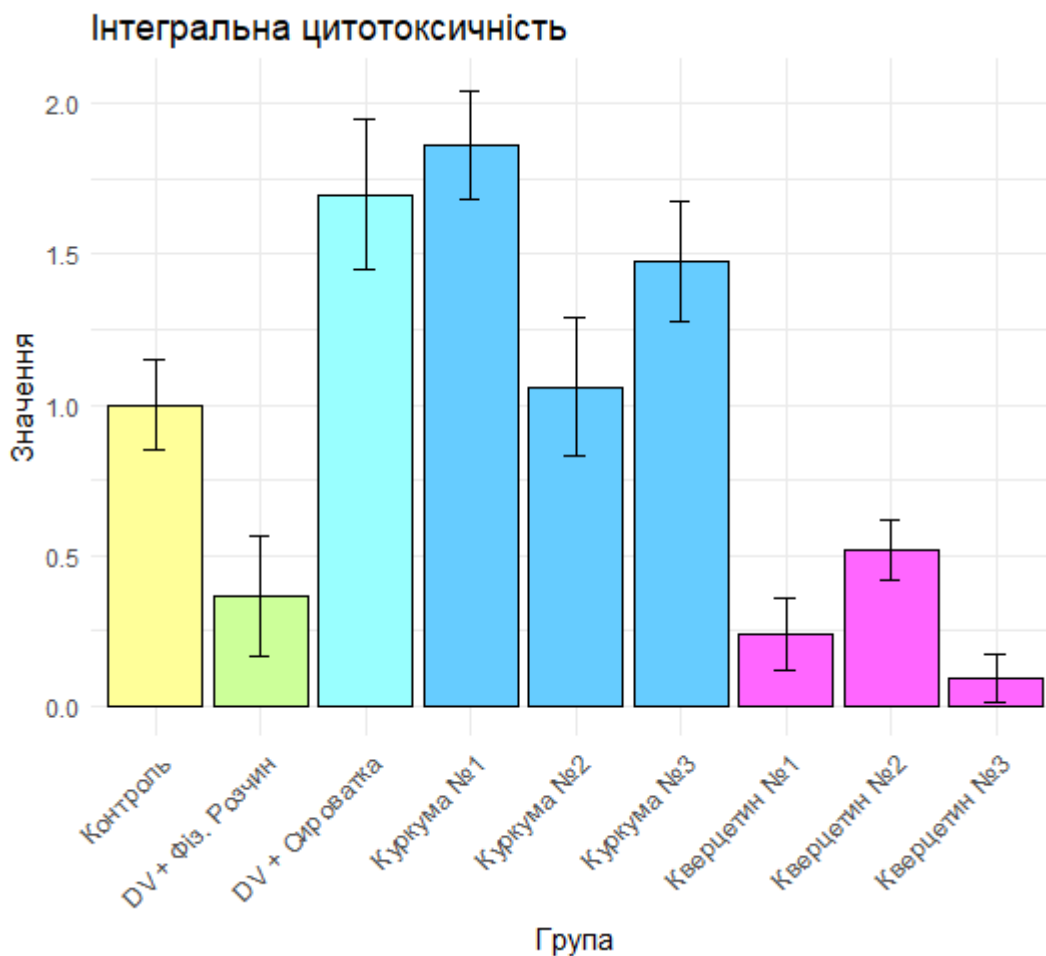
Невеликі об'єми флакона(ів) з рекомбінантним білком NRF2 іноді можуть потрапити в ущільнення флакона з продуктом під час транспортування та зберігання. Якщо необхідно, ненадовго відцентрифугуйте флакон на настільній центрифугі, щоб видалити всю рідину з кришки контейнера. Деякі продукти можуть потребувати доставки з сухим льодом, і може стягуватися додаткова плата за сухий лід [40].

## **3.3. Оцінка цитотоксичності вихідної сировини (куркуми та сировини)**

Було проведено два тести на оцінку цитотоксичності сировини, яка контролює експресію досліджуваного фактору.

### **3.3.1. Оцінка цитотоксичності за допомогою біоіндикатора *Dunaliella viridis***

За результатами першого тесту було побудовано графік 1.



Графік 1. Інтегральна цитотоксичність, виміряна за допомогою *Dunaliella viridis*.

DV - контрольний зразок;

DV + ФР - водорості, до яких додали фіз розчин;

DV + СИРОВАТКА - водорості, до яких додали сироватку пацієнта;

№1 – концентрація розчиненої речовини 0,1мл/1мл;

№2 – концентрація розчиненої речовини 0,01мл/1мл;

№3 – концентрація розчиненої речовини 0,001мл/1мл;

Експеримент мав 4 раунди повторів. На графіку показані усереднені показники, враховуючи значення без випадкових відхилень. За результатами бачимо певні залежності:

При додаванні куркуми або сироватки пацієнтів до водоростей показники інтегральної цитотоксичності зростають найбільше.

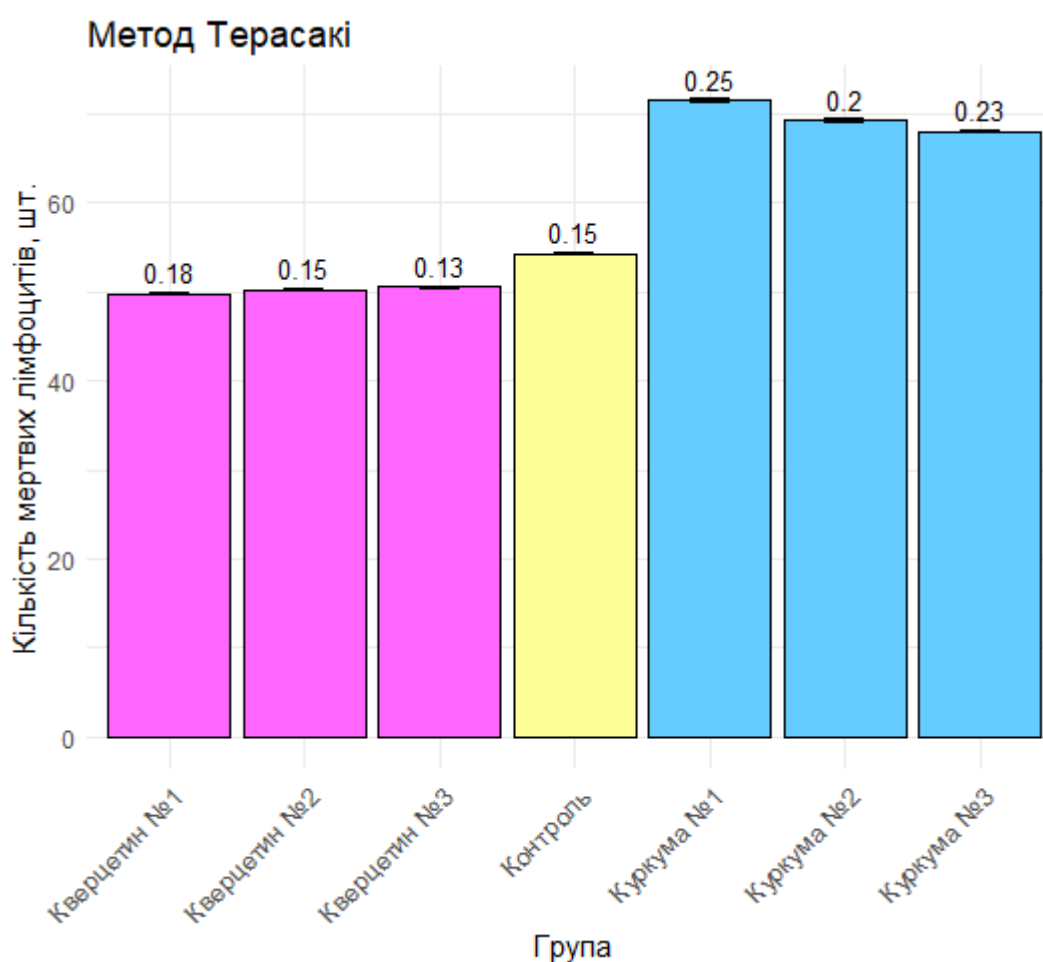
При додаванні кверцетину чи фізичного розчину показники інтегральної цитотоксичності зменшувались та були в межах норми.

Окрім цього, кореляції між концентрацією розчиненої речовини та коефіцієнтом цитотоксичності знайдено при проведенні даної оцінки не було.

Звідси ми можемо зробити висновок, що кверцетин не несе негативного впливу на клітинний уміст водоростей *D. Viridis*, на відміну від куркуми.

### 3.3.2. Оцінка цитотоксичності за допомогою метода Терасакі

На основі даних, отриманих за допомогою метода Терасакі було побудовано графік 2.



Графік 2. Цитотоксичність, виміряна за допомогою метода Терасакі.

Контроль – кількість мертвих лімфоцитів в обробленій по методиці крові пацієнтів.

№1 – концентрація розчиненої речовини 0,1мл/1мл;

№2 – концентрація розчиненої речовини 0,01мл/1мл;

№3 – концентрація розчиненої речовини 0,001мл/1мл;

Як бачимо з графіка 2, середні значення для розчинів з куркумою призводять до підвищення кількості мертвих лімфоцитів у порівнянні з 54 клітинами в контрольному зразку. Причому, зі зменшенням концентрації куркуми в розведеннях спостерігається зменшення загиблих забарвлених клітин з 72 до 68. Це може говорити нам про негативний вплив підвищених концентрацій куркуми на внутрішнє середовище організму.

Що стосується кверцетину, то ми бачимо зменшення забарвлених клітин з зруйнованою клітинною стінкою з 54 (контроль) до 50. При цьому, узагальнено концентрація кверцетину в розведеннях не впливає на лімфоцитотоксичність. Але якщо розглядати конкретні випадки з окремими пацієнтами, то спостерігається цікава залежність: у випадку з пацієнтами, які мають підтверджену онкологію шлунково-кишкового тракту зменшення концентрації кверцетину призводить до зменшення кількості зруйнованих клітин; якщо мова йде про пацієнтів з вогнепальним пораненням чи пухлиною Клацкена, то зменшення концентрації кверцетина в розведеннях навпаки призводить до збільшення кількості мертвих лімфоцитів.

На закінчення, кверцетин захищає від DOXO-індукованої кардіоміопатії за рахунок збільшення експресії Nrf2 і, таким чином, посилення антиоксидантного захисту та відновлення біохімічних та гістологічних порушень [41]. Вірогідно, саме це і стало причиною позитивного впливу від додавання розчинів кверцетину. В іншій літературі також були знайдені підтвердження отриманим результатам щодо кверцетину. Зокрема, серед різноманітних природних сполук кверцетин продемонстрував чудові протиракові та протизапальні властивості. Експерименти *in vitro* та *in vivo* показали, що кверцетин має цитотоксичну дію на клітини раку яєчників. Незважаючи на отримання хороших результатів як *in vitro*, так і *in vivo*, лише кілька клінічних досліджень оцінювали протиракову дію кверцетину [42]. Таким чином, здається, що подальші клінічні дослідження можуть

представити кверцетин як терапевтичний засіб окремо або в комбінації з іншими хіміотерапевтичними препаратами в клінічних умовах.

Звідси ми можемо зробити висновок, що розчини кверцетину не несуть негативного впливу на цілісність лімфоцитів, навіть навпаки – наявність кверцетину в розчині продукує меншу кількість ушкоджених клітин, у порівнянні з контролем. А додавання куркуми навпаки сприяє підвищенню показників лімфоцитотоксичності.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

В даній роботі розглядається роль та значення сигнальної системи Keap1-Nrf2 в регуляції цитопротекторних систем. Ця система включає два основних білки - Keap1 (Kelch-like ECH-асоційований білок 1) та Nrf2 (ядровий фактор 2, залежний від електрофілів).

Keap1 виступає як регуляторна молекула, що контролює активність Nrf2. У нормальних умовах, Keap1 утримує Nrf2 в цитоплазмі та сприяє його деградації. Але при виникненні стресових сигналів, таких як оксидативний стрес або взаємодія з токсичними сполуками, Keap1 втрачає здатність взаємодіяти з Nrf2. Це призводить до активації Nrf2, який здатен проникати в ядро клітини. У ядрі Nrf2 взаємодіє з антиоксидантним реакційним елементом (ARE), розташованим у промоторах цитопротекторних генів. Ця взаємодія викликає транскрипцію генів, що кодують ферменти антиоксидантної системи, фазу II детоксифікації та інші захисні молекули.

Таким чином, активація сигнальної системи Keap1-Nrf2 сприяє підвищенню вираження цитопротекторних генів, які забезпечують клітинам захист від оксидативного стресу, запалення, токсичних речовин і інших небезпечних факторів. Це включає антиоксидантні ферменти, які нейтралізують вільні радикали, ферменти детоксифікації, що вилучають токсичні сполуки з клітини, і білки, що забезпечують регуляцію запалення, онкогенезу, репарацію ДНК та інші процеси в клітині.

Роль сигнальної системи Keap1-Nrf2 полягає в підтримці гомеостазу та забезпеченні клітинної виживаності в умовах стресу. Це особливо важливо в контексті розвитку різних захворювань, таких як онкологічні захворювання, хронічні запальні захворювання, нейродегенеративні захворювання та інші.

Активація Keap1-Nrf2 сприяє покращенню клітинного захисту, зменшенню пошкоджень ДНК, зменшенню окислювального стресу та запобіганню утворенню вільних радикалів. Вона також сприяє відновленню клітинних компонентів та регулює запальні відповіді, що сприяє загоєнню тканин та ремоделюванню.

Значення сигнальної системи Keap1-Nrf2 в регуляції цитопротекторних систем полягає не лише в клітинному рівні, але і в контексті загальної фізіології та захворювань. Розуміння і маніпулювання цією системою може мати важливі терапевтичні наслідки, сприяючи покращенню захисту клітин і зменшенню ураження від різних патологічних процесів.

## ВИСНОВКИ

В ході даної роботи було досягнуто таких поставлених задач:

1. Було запропоновано та оцінено 2 методи екстракції вихідної сировини, якою були обрані куркума та кверцетин, для збільшення рівню досліджуваного фактору Nrf2 в організмі. Зокрема, метод екстракції ферментативною обробкою був визначений більш ефективним за виходом цільового продукту, однак менш економічно привабливим.

2. Було проаналізовано можливість отримання Nrf2 рекомбінантним шляхом за допомогою спеціально підбраного модифікованого вектору рЕТ28b та культури клітин продуцентів, якими можуть виступати як більш звичний штам *E. coli*, так і мезенхімальні стовбурові клітини. Обидва методи вважаються достатньо ефективними; успішність одного з них показує сучасний фармацевтичний ринок, де вже зараз можна придбати цільовий транскрибуючий фактор, синтезований за допомогою культури кишкової палички.

3. За рахунок оцінки лімфоцитотоксичності методом Terasaki та оцінки інтегральної цитотоксичності з використанням біоіндикаторів *Dunaliella viridis* вдалося встановити, що обидва теста на цитотоксичність показали високі показники лімфоцитотоксичності та інтегральної цитотоксичності вище норми як для високої, так і для низької концентрації куркуми. В цей же час додавання кверцетину в будь-якій з досліджуваних концентрацій призводило навіть до зниження коефіцієнту цитотоксичності у порівнянні з контролем.

Отже, сигнальна система Keap1-Nrf2 є важливим елементом регуляції цитопротекторних систем і відіграє ключову роль в забезпеченні клітинної виживаності та захисту клітин в умовах стресу та патологічних станів.

В ході даного дослідження було досягнуто поставлених цілей та проаналізовано отримані результати, які представляють певний інтерес та новизну для наукової спільноти. Отримані данні узгоджуються та доповнюють вже існуючу інформацію та літературу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cytoprotection against Oxidative Stress and the Regulation of Glutathione Synthesis / D. A. Dickinson et al. *Biological Chemistry*. 2003. Vol. 384, no. 4. URL: <https://doi.org/10.1515/bc.2003.061>.
2. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013. Vol. 53, no. 1. P. 401–426. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.
3. He F., Ru X., Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, no. 13. P. 4777. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>.
4. Adaptor proteins: Flexible and dynamic modulators of immune cell signalling / P. Borowicz et al. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2020. Vol. 92, no. 5. URL: <https://doi.org/10.1111/sji.12951>.
5. Ngo V., Duennwald M. L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants*. 2022. Vol. 11, no. 12. P. 2345. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>.
6. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia / C. Yang et al. *Brain Research*. 2009. Vol. 1282. P. 133–141. URL: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.009>.
7. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38 / A. B. Granado-Serrano et al. *Chemico-Biological Interactions*. 2012. Vol. 195, no. 2. P. 154–164. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.12.005>.
8. Modulation of Nrf2 by quercetin in doxorubicin-treated rats / A. Sharma et al. *Heliyon*. 2020. Vol. 6, no. 4. P. e03803. URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03803>.
9. Kryszczuk M., Kowalczyk O. Significance of NRF2 in physiological and pathological conditions an comprehensive review. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2022. Vol. 730. P. 109417. URL: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109417>.

10. Мироненко А.М., Помелова В.Г. Цитопротекторні засоби в лікуванні запальних захворювань // Експериментальна і клінічна медицина. 2019. № 3. С. 78-83.
11. Valentová K. Cytoprotective Activity of Natural and Synthetic Antioxidants. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, no. 8. P. 713. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox9080713>.
12. Verma N. K., Tran T., Kelleher D. Editorial: Adaptor Protein Regulation in Immune Signalling. *Frontiers in Immunology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00441>.
13. Immunobiology: The immune system in health and disease / ed. by J. Charles. 6th ed. New York : Garland Science, 2005.
14. Allosteric regulation and inhibition of protein kinases / V. R. Mingione et al. *Biochemical Society Transactions*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1042/bst20220940>.
15. Balasubramani A. Tempering lymphocyte activation. *Science*. 2020. Vol. 369, no. 6501. P. 264.23–266. URL: <https://doi.org/10.1126/science.369.6501.264-w>.
16. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013. Vol. 53, no. 1. P. 401–426. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.
17. Nrf2: Redox and Metabolic Regulator of Stem Cell State and Function / X. Dai et al. *Trends in Molecular Medicine*. 2020. Vol. 26, no. 2. P. 185–200. URL: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.007>.
18. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015. Vol. 88. P. 93–100. URL: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006>.
19. Canning P., Sorrell F. J., Bullock A. N. Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015. Vol. 88. P. 101–107. URL: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.034>.

20. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2 / A. L. Eggler et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. Vol. 102, no. 29. P. 10070–10075. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.0502402102>.
21. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer / E. Kansanen et al. *Redox Biology*. 2013. Vol. 1, no. 1. P. 45–49. URL: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>.
22. Multifaceted Roles of the KEAP1–NRF2 System in Cancer and Inflammatory Disease Milieu / H. Panda et al. *Antioxidants*. 2022. Vol. 11, no. 3. P. 538. URL: <https://doi.org/10.3390/antiox11030538>.
23. Taguchi K., Yamamoto M. The KEAP1–NRF2 System as a Molecular Target of Cancer Treatment. *Cancers*. 2020. Vol. 13, no. 1. P. 46. URL: <https://doi.org/10.3390/cancers13010046>.
24. Regulation of innate immunity by Nrf2 / D. van der Horst et al. *Current Opinion in Immunology*. 2022. Vol. 78. P. 102247. URL: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102247>.
25. Nrf2 attenuates the innate immune response after experimental myocardial infarction / D. I. Bromage et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022. Vol. 606. P. 10–16. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.03.043>.
26. Lee Y.-J., Lee D. M., Lee S.-H. Nrf2 Expression and Apoptosis in Quercetin-treated Malignant Mesothelioma Cells. *Molecules and Cells*. 2015. Vol. 38, no. 5. P. 416–425. URL: <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.2268>.
27. SEROTYPING FOR HOMOTRANSPLANTATION XVIII. REFINEMENT OF MICRODROPLET LYMPHOCYTE CYTOTOXICITY TEST / K. K. MITTAL et al. *Transplantation*. 1968. Vol. 6, no. 8. P. 913–927. URL: <https://doi.org/10.1097/00007890-196811000-00006>.
28. Characteristics of the response of the microalga (*Dunaliella viridis*) to cerium compounds in culture / E. M. Klimova et al. *Biosystems Diversity*. 2019. Vol. 27, no. 2. P. 142–147. URL: <https://doi.org/10.15421/011919>.

29. Novel extraction, rapid assessment and bioavailability improvement of quercetin: A review / M. F. Manzoor et al. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2021. Vol. 78. P. 105686. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105686>.
30. Azemi N., Basar N., Toemen S. Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) of Phytochemicals with Response Surface Methodology (RSM) in Curcuma Xanthorrhiza. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*. 2020. Vol. 23, no. 13. URL: <https://doi.org/10.36295/asro.2020.231306>.
31. Yang Y., Zhang F. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2008. Vol. 15, no. 4. P. 308–313. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.05.001>.
32. Effect of curcumin and quercetin on lysosomal enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats / M. B. Chougala et al. *Clinical Nutrition*. 2012. Vol. 31, no. 5. P. 749–755. URL: <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.02.003>.
33. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity / M. Mohammadzadeh et al. *Cell Stress and Chaperones*. 2012. Vol. 17, no. 5. P. 553–565. URL: <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0331-9>.
34. Sandhu S. S. Recombinant DNA Technology. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, 2013.
35. An on-line method for pressurized hot water extraction and enzymatic hydrolysis of quercetin glucosides from onions / S. Lindahl et al. *Analytica Chimica Acta*. 2013. Vol. 785. P. 50–59. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.031>.
36. Onion skin waste as a valorization resource for the by-products quercetin and biosugar / I. S. Choi et al. *Food Chemistry*. 2015. Vol. 188. P. 537–542. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.028>.
37. Co-Existence of *mcr-1* and *bla*<sub>NDM-5</sub> in an *Escherichia coli* Strain Isolated from the Pharmaceutical Industry, WWTP / H. Han et al. *Infection and Drug Resistance*. 2020. Volume 13. P. 851–854. URL: <https://doi.org/10.2147/idr.s245047>.

38. A designer biomimetic vector with a chimeric architecture for targeted gene transfer / Y. Wang et al. *Journal of Controlled Release*. 2009. Vol. 137, no. 1. P. 46–53. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.03.005>.
39. Chumanov R. S., Burgess R. R. Expression, purification, and refolding of active Nrf2 transcription factor fused to protein transduction TAT tag. *Protein Expression and Purification*. 2010. Vol. 74, no. 2. P. 280–288. URL: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.06.017>.
40. NRF2, FLAG-Tag Recombinant. *BPS Bioscience Inc.* URL: <https://bpsbioscience.com/nrf2-flag-tag-recombinant-101463>.
41. Modulation of Nrf2 by quercetin in doxorubicin-treated rats / A. Sharma et al. *Heliyon*. 2020. Vol. 6, no. 4. P. e03803. URL: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03803>.
42. Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells / A. Vafadar et al. *Cell & Bioscience*. 2020. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00397-0>.