

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ВОРОБЬЕВА АНАСТАСИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ
ОРЕГАНО И ЧАБЕРА В ОПЫТАХ *IN VIVO***

03.01.02 Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., проф. Бурлакова Е.Б.

Москва

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список использованных сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
Роль растительных антиоксидантов в профилактике заболеваний, вызванных окислительным стрессом	10
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Объекты исследования	41
2.1.1. Характеристика эфирных масел чабера и орегано	41
2.1.2. Характеристика экспериментальных животных	42
2.2. Дизайн экспериментов	43
2.3. Методы исследования	45
2.3.1. Спектрофотометрический метод	45
2.3.2. Метод газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс спектрометрии	52
2.3.3. Исследование биологической активности эфирного масла орегано на культуре клеток китайского хомячка	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1. Изучение биологической активности эфирного масла орегано	60
3.1.1. Влияние эфирного масла орегано на продолжительность жизни здоровых мышей линии Balb/c	60
3.1.2. Исследование действия эфирного масла орегано <i>in vitro</i>	63
3.1.3. Влияние эфирного масла орегано на состояние иммунокомпетентных органов мышей Balb/c	68
3.1.4. Влияние эфирного масла орегано на физико-химические характеристики эритроцитов мышей Balb/c с увеличением возраста	69
3.1.5. Возрастные изменения состава жирных кислот, показателей ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в печени мышей Balb/c и влияние эфирного масла орегано на эти параметры	73
3.1.6. Возрастные изменения в составе жирных кислот липидов в мозге мышей линии Balb/c и влияние эфирного масла орегано на эти параметры	80

3.2. Влияние эфирного масла орегано на прививаемость и развитие карциномы Льюис, на параметры ПОЛ в эритроцитах, печени и мозге мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black	85
3.3. Влияние эфирного масла чабера на продолжительность жизни и биохимические характеристики тканей и органов мышей линии AKR со спонтанным лейкозом	97
3.3.1. Влияние приема эфирного масла чабера на продолжительность жизни мышей и развитие спонтанного лейкоза	97
3.3.2. Влияние приема эфирного масла чабера на физико-химические характеристики эритроцитов	100
3.3.3. Влияние приема эфирного масла чабера на состав жирных кислот в органах мышей	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ	115
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	116

Список использованных сокращений

АО – антиоксидант

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГП – глутатион-пероксидаза

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатион-S-трансфераза

ДГК – докозагексаеновая кислота

ДМСИ – Дюльбекко модифицированная среда Игла – питательная среда для культивирования клеток

ЖК – жирная кислота

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты

НЖК – насыщенные жирные кислоты

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СПЖ – средняя продолжительность жизни

ТБК-АП – активные продукты окисления, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой

ЭКО – эффективность колониеобразования

ЭМ – эфирное масло

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Для повышения антиоксидантного статуса организма широко используются синтетические антиоксиданты, в том числе являющиеся аналогами природных молекул [1]. Ряд эффективных и нетоксичных антиоксидантов (АО), в основном производных экранированных фенолов и оксипроизводных азотистых гетероциклов, были синтезированы в ИХФ РАН. Для этих АО были проведены широкие исследования антиканцерогенного действия АО и закономерностей их влияния на опухолевые процессы [2–4]. Эмануэлем Н.М. и Франкфурт О.С. в 1967 г. было обнаружено антиканцерогенное действие АО дибутилокситолуола [5]. Биологическое действие АО основано на их способности нейтрализовать свободные радикалы, а также влиять на пути передачи клеточных сигналов. Показано, что антиоксиданты нормализуют регуляцию клеточного цикла, предотвращают распространение опухоли и ангиогенез, подавляют воспаление, стимулируют активность ферментов детоксификации ксенобиотиков и, таким образом, препятствуют канцерогенезу [6].

В ИХФ РАН более полувека назад было проведено кинетическое изучение модельных реакций старения и показана перспективность АО в качестве геропротекторов [7]. В последние годы особое внимание ученые всего мира уделяют поиску новых природных антиоксидантов, которые, в отличие от синтетических, практически не имеют побочных эффектов, при этом они обладают комплексом различных видов биологической активности. Особый интерес представляет изучение таких природных соединений, как эфирные масла (ЭМ), которые ответственны за фармакологические свойства многих лекарственных растений. Их благотворное действие на организм людей проявляется и при вдыхании воздуха, содержащего малые количества ЭМ. Отмечено, что в ряде стран Средиземноморья, Кавказа проживает самое большое число долгожителей. В жаркое время года в воздухе этих регионов содержатся летучие компоненты пряных трав (тимьяна, орегано, чабера, чабреца, лаванды, розмарина и других), которые постоянно попадают в организм живущих там людей. Кроме того, пряная зелень является обязательным компонентом питания и, безусловно, вносит положительный вклад в сохранение здоровья населения этих регионов. Вполне вероятно, что именно постоянное употребление малых доз летучих АО является одним из факторов, отвечающих за долгую и здоровую жизнь этих людей. Однако исследований по этой проблеме не проводилось.

В последние годы активно изучается противопаразитарная, фунгицидная, анальгетическая, противовоспалительная, антирадикальная, антиоксидантная и противораковая активность ЭМ, при этом большая часть исследований выполнена в модельных экспериментах

на культурах клеток *in vitro* [8]. К сожалению, работ с лабораторными животными *in vivo* практически нет, так же как нет данных о влиянии на организм и на продолжительность жизни долгосрочного приема ЭМ. Поэтому изучение действия ЭМ на физиологические и биохимические процессы *in vivo* на различных этапах жизни от рождения до старости лабораторных животных является важной и актуальной задачей.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось изучение влияния длительного систематического приема эфирных масел в малых дозах на физиологические и биохимические характеристики организма мышей в норме и при патологии.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать действие систематического приема эфирного масла орегано в малых дозах на протяжении всей жизни здоровыми мышами линии Balb/c на следующие показатели: продолжительность жизни животных, степень гемолиза и содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах мышей, активность АО ферментов в клетках печени и жирнокислотный (ЖК) состав печени и мозга мышей.
2. Изучить действие эфирного масла орегано в малой дозе на прививаемость, размеры солидной опухоли карциномы Льюис и параметры ПОЛ у мышей-гибридов F1 DBA× C57 Black.
3. Исследовать влияние систематического приема эфирного масла чабера в малой дозе на продолжительность жизни, развитие спонтанного лейкоза и параметры ПОЛ у мышей высокоракетной линии AKR.

Научная новизна

Впервые в экспериментах *in vivo* установлено, что систематический прием эфирных масел в малых дозах на протяжении всей жизни здоровыми мышами линии Balb/c оказывал геропротекторное действие: средняя продолжительность жизни животных увеличивались на 120 дней (на 17% больше, чем в контроле). Такое действие основано на наличии у ЭМ орегано антибактериальной, противовоспалительной, противопаразитарной и противоопухолевой активности [9], а также биоантиоксидантных свойств. Найдено, что ЭМ орегано снижало уровень ПОЛ в органах и тканях мышей, модулировало ферментативную защитную систему печени, повышало антиоксидантный статус организма.

Впервые изучены изменения в составе ЖК в мозге и печени здоровых мышей Balb/c от рождения до старости. Выявлено, что в мозге стареющих животных снижалось содержание насыщенных и полиненасыщенных ЖК и значительно увеличивалось содержание

мононенасыщенных ЖК. Прием ЭМ орегано защищал мозг от возрастных изменений, так как существенно улучшал ЖК состав мозга стареющих мышей, обогащая его полиненасыщенными ЖК.

Впервые в опытах *in vivo* установлена противораковая активность эфирных масел чабера и орегано. Прием ЭМ чабера снижал частоту лейкозов у мышей высокораковой линии АКР, увеличивал среднюю продолжительность их жизни на 47 дней (20%), уменьшал интенсивность окислительного стресса в органах и тканях животных. Прием мышами-гибридами F1 DBA×C57ЭМ орегано в течение 3-х месяцев повышал антиоксидантный статус организма, существенно снижал степень прививаемости (в 1,8 раза) и максимальные размеры солидной опухоли карциномы Льюис (на 30%) у мышей опытных групп.

Практическое значение работы

Полученные в работе данные имеют важное практическое значение. Главным результатом является обнаруженная способность ЭМ орегано увеличивать продолжительность жизни здоровых мышей. Установлено, что при старении мышей происходило увеличение интенсивности ПОЛ в различных органах, изменялся состав ЖК в мозге мышей, что влияло на его функциональную активность. Систематический прием ЭМ орегано существенно снижал интенсивность ПОЛ в органах и тканях здоровых мышей, значительно улучшал баланс жирных кислот в мозге стареющих животных, уменьшал количество насыщенных ЖК и обогащал его полезными полиненасыщенными ЖК, уровень которых в процессе старения снижался.

Важнейшим результатом работы является найденная у ЭМ орегано и чабера противораковая активность. Оба ЭМ являются перспективными натуральными профилактическими геропротекторными средствами и их систематический прием в малых дозах может быть эффективен для профилактики различных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Эфирные масла чабера и орегано при систематическом приеме в течение всей жизни являются эффективными биоантиоксидантами в опытах *in vivo*, снижают уровень окислительного стресса в органах и тканях здоровых мышей и мышей со спонтанным лейкозом линии АКР.

2. Эфирное масло орегано проявляет свойства геропротектора. Ежедневный прием масла на протяжении всей жизни увеличивает продолжительность жизни мышей и нивелирует ряд изменений, происходящих при старении организма.

3. Эфирные масла орегано и чабера обладают противораковым действием. Систематический прием ЭМ чабера уменьшает частоту лейкозов и увеличивает среднюю

продолжительность жизни мышей AKR, а ЭМ орегано снижает степень прививаемости и максимальные размеры опухоли у мышей-гибридов F1 DBA× C57 Black карциномой Льюис.

Апробация работы

Основные материалы диссертации были доложены и обсуждены на Моск. Межд. конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2009, 2010, 2011, 2012), 5 Межд. конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (С.-Петербург, 2009, 2012), Национальной научно-практ. конф. с межд. участием «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленск, 2009), VII Всеросс. конф. с молодежной научной школой (Уфа, 2009), IX, X и XI Ежегодных межд. конф. «ИБХФ РАН - ВУЗЫ» (Москва, 2009, 2010, 2011), Межд. конф. «Генетика продолжительности жизни и старения» (Сыктывкар, 2010), VI Всеросс. конф. «Химия и технология растительных веществ» (С.-Петербург, 2010), IX Межд. симпозиуме «Биологические механизмы старения» (Харьков, 2010), VIII Межд. конф. «Биоантиоксидант» (Москва, 2010), III Евразийском конгрессе по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010» (Москва, 2010), Первой Росс. конф. по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием (Москва, 2013), Межд. научно-практической конф. «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2013).

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена в ИБХФ РАН рамках планов научно-исследовательских работ Института по теме «Природные и синтетические антиоксиданты. Синтез, кинетические характеристики, механизм действия в системах различной степени сложности, синергизм, специфическая активность, прикладные проблемы. Изучение антиоксидантной активности эфирных масел и ароматизаторов», а также при финансовой поддержке ОХНМ Президиума РАН: проект «Исследование биологической активности эфирных масел пряно-ароматических растений» - в 2009-2011 гг. и проект «Исследование антирадикальных и антиоксидантных свойств натуральных эфирных масел и экстрактов пряно-ароматических растений, обладающих физиологической активностью» - в 2012-2014 гг.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 39 работ: 8 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 14 статей в сборниках научных трудов и 17 публикаций в сборниках материалов конференций. Получен патент на изобретение № 2475258 от 20.02.13.

Личный вклад автора.

Экспериментальные данные по изучению влияния эфирных масел на продолжительность жизни животных, результаты биохимических и биофизических опытов, характеризующие состояние ряда систем органов животных, а также цитогеронтологические данные получены автором лично или при его непосредственном участии. Постановка работы, планирование экспериментов, их интерпретация и обобщение результатов проводились совместно с научным руководителем. Анализ данных литературы и написание диссертации проведено автором лично. Материалы диссертации доложены автором в виде устных и стендовых докладов на конференциях, симпозиумах, конгрессах.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 136 страницах печатного текста, содержит 22 рисунка и 19 таблиц. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 253 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Роль растительных антиоксидантов в профилактике заболеваний, вызванных окислительным стрессом.

Окислительный стресс

Практически все жизненные процессы на Земле осуществляются при участии кислорода. Считается, что около 1,5 – 5% потребляемого кислорода превращается в свободные радикалы - активные формы кислорода (АФК), поэтому содержание АФК напрямую зависит от количества вдыхаемого кислорода. Основным местом потребления кислорода внутри клетки является электрон-транспортная цепь митохондрий, и именно в этих органеллах в основном происходит образование эндогенных АФК. Кроме того, АФК и оксид азота являются побочными продуктами ряда метаболических процессов, протекающих в клетке. Активные кислородные метаболиты являются непосредственными участниками множества регуляторных и сигнальных процессов, они контролируют метаболизм глюкозы, эйкозаноидов, изменяют концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} , стимулируют рост клеток. Помимо самих АФК, способностью модулировать передачу сигнала обладают и окисленные ими продукты, например, липопероксиды. Кроме того, обладая способностью окислять тиольные группы, АФК влияют на конформацию многих белков. АФК принимают участие в нейтрализации микроорганизмов фагоцитами, способствуют обновлению клеточных мембран [10–12].

АФК обладают повышенной реакционной способностью, поэтому в клетке они легко вступают в реакции окисления практически любых макромолекул с образованием высокотоксичных соединений. Так, при окислении ДНК происходит модификация азотистых оснований, окисление дезоксирибозы, разрыв цепей, образуются поперечные сшивки ДНК-белок. Под действием АФК изменяется работа генов, контролирующих процессы клеточной пролиферации, сигнальной трансдукции, и возникают мутации. Окислительное повреждение ДНК митохондрий провоцирует рак и сопровождает старение [13]. Белки, подвергшиеся действию АФК, теряют функциональную активность, изменяется их растворимость, образуются сшивки с другими макромолекулами. Например, помутнение хрусталика при катаракте по причине образования высокомолекулярных агрегатов в значительной мере обусловлено именно окислительным повреждением белков кристаллинов. Липофусцин, накапливающийся при старении, является продуктом агрегации белков с пероксидами липидов. Мишенью свободных радикалов в клеточных мембранах являются полиненасыщенные жирные кислоты. Образующиеся пероксиды жирных кислот в липидах нарушают химические и

физические свойства мембран: проницаемость, текучесть [14] и, как следствие, изменяют активность и функциональные свойства встроенных в мембрану белков.

Окислительный свободно-радикальный процесс носит цепной характер. По мере его протекания в реакции окисления вовлекаются все новые и новые молекулы, образуются супероксидный анион-радикал, гидропероксидный радикал HO_2^{\cdot} , гидроксил-радикал HO^{\cdot} , пероксид водорода H_2O_2 , гипохлорная кислота HOCl , пероксинитрит ONOO^{\cdot} , ряд липидных радикалов, и, таким образом, пул свободных радикалов увеличивается лавинообразно. Такая неконтролируемая окислительная модификация ключевых биомакромолекул может приводить к необратимым нарушениям их функций, повреждению клеточных структур вплоть до их деструкции. Особое физиологическое состояние клеток, при котором нарушается обратимая регуляция между процессами генерации свободных радикалов (активных форм кислорода и азота) и их утилизацией защитными системами клетки называют окислительным стрессом. Как показали тысячи исследований, окислительный стресс неизменно сопровождает патогенез большинства известных заболеваний, существенно осложняя их течение. Примеры патологий, включающих свободно-радикальную составляющую, приведены в Таблице 1.1 [15].

Таблица 1.1.

Примеры патологий, связанных с действием свободных радикалов

<i>Болезни сердечно-сосудистой системы</i>	<i>Другие болезни</i>
Атеросклероз	Болезни почек
Ишемия, инфаркт миокарда	Болезни желудочно-кишечного тракта
Гипертония	Панкреатит
Инсульт	Анемии
Патология сосудов	Преждевременное старение
Сердечная недостаточность	Глазные болезни, катаракта
<i>Опухолевые процессы</i>	Кожные заболевания
Канцерогенез	Аллергия
Рост злокачественных новообразований	Лучевая болезнь
<i>Нейродегенеративные заболевания</i>	Воспаление, ревматоидный артрит
Болезнь Альцгеймера	Болезни курильщиков
Болезнь Паркинсона	Бронхо-легочные заболевания

Развитие окислительного стресса и избыток АФК контролируется внутриклеточной антиоксидантной ферментативной системой (супероксиддисмутаза, каталаза,

глутатионпероксидаза и др.), а также низко-молекулярными соединениями (витамины E, C, глутатион восстановленный, флавоноиды, каротиноиды). Снизить количество свободных радикалов позволяет также экзогенное поступление антиоксидантов с пищевыми продуктами или специальными добавками.

Основные свойства антиоксидантов

Антиоксиданты – вещества, способные непосредственно взаимодействовать со свободными радикалами с образованием малоактивных соединений. Биоантиоксидантами (БАО) называют вещества, которые в модельных свободно-радикальных процессах окисления проявляют свойства ингибиторов реакций окисления и сохраняют это свойство при введении их в биосистему [16]. Нарушение хотя бы одного постулата не позволяет называть вещества биоантиоксидантами. Несмотря на то, что увеличить устойчивость липидов к окислению можно с помощью веществ, являющихся синергистами к природным антиоксидантам или же превращающихся в антиоксиданты в процессе метаболизма, БАО обязательно должны обладать способностью ингибировать окислительный свободно-радикальный процесс в модельных реакциях. Это свойство позволяет прогнозировать спектр их биологических эффектов и осуществлять направленный синтез препаратов. При изучении роли антиоксидантов в нормальных физиологических процессах было сделано заключение о том, что они являются универсальными модификаторами состава, структуры и функциональной активности мембран, и что многие закономерности их влияния на клеточный метаболизм могут быть объяснены с этих позиций [17–19]. В настоящее время считается, что БАО могут влиять на клеточный метаболизм путем их взаимодействия со свободными радикалами различной природы; либо встраиванием БАО в структуру мембраны и изменением функциональной активности мембраны, связанной с изменением ее вязкостных свойств (текучести); влиянием непосредственно на активность мембранных белков-ферментов, рецепторов, на генетический аппарат клетки, в том числе на экспрессию генов, а также на регуляторные системы клетки и опосредованно на ее метаболизм в целом.

При выборе и оценке свойств БАО следует учитывать, что их эффективность зависит от природы АФК. Константы скорости реакций одних и тех же БАО с разными радикалами могут существенно (на порядки) отличаться друг от друга. Так, константа скорости реакции α -токоферола с OH^\cdot радикалом составляет 8×10^{10} л/(моль сек), с липидным RO_2^\cdot радикалом – $3,4 \times 10^6$ л/(моль сек), а с супероксидным анион радикалом $\text{O}_2^{\cdot-}$ – 47×10^4 л/(моль сек) [20, 21]. Кроме того, многие БАО имеют экстремальную зависимость эффекта от концентрации. В больших концентрациях антиоксиданты начинают не тормозить, а

напротив, ускорять свободно-радикальные реакции. Это бывает связано либо с высокой активностью накапливающихся радикалов из ингибиторов, либо с преимущественным расходом эндогенных антиоксидантов по сравнению с дополнительно вводимыми. Многие из этих эффектов будут зависеть от начальных характеристик свободно-радикальных процессов и значений начального уровня антиоксидантов [22].

Изучение механизма действия БАО показало, что между отдельными показателями клеточного метаболизма, изменяющихся под действием антиоксидантов, существует целая система связей. Бурлаковой Е.Б. с сотрудниками, была предложена схема физико-химической регуляторной системы, поддерживающей уровень свободно-радикальных реакций в липидах, с одной стороны, и регулирующей обмен мембранных липидов и скорость расходования антиоксидантов в липидах, с другой стороны (Рисунок 1.1) [23, 24].

Было показано, что увеличение концентрации АО приводит к уменьшению скорости пероксидного окисления липидов, снижению концентрации продуктов окисления и скорости выхода липидов из мембран, обогащению их ненасыщенными липидами и, соответственно, увеличению окисляемости липидов. Увеличение окисляемости ведет, в свою очередь, к увеличению скорости снижения антиоксидантной активности и, соответственно, к последующему возвращению АО активности и скорости пероксидного окисления к норме. Обратная картина наблюдается при уменьшении АО активности системы, увеличении скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ). Существование такой системы регуляции было обнаружено практически для всех изученных внутриклеточных и клеточных мембран клеток животных, растительных организмов и микроорганизмов. Следует иметь в виду, что изменение состава липидов и степени их окисляемости приводит к изменению текучести различных слоев мембраны. Все указанные характеристики также влияют на активность и кинетические характеристики мембранных белков-ферментов, рецепторов, а потому изменение скорости ПОЛ может приводить к изменению не только структуры, но и функциональной активности мембран. Во всех мембранах в норме наблюдаются одинаковые закономерности между параметрами, а различие заключается лишь во времени релаксации системы (от минут до суток) [23, 24].

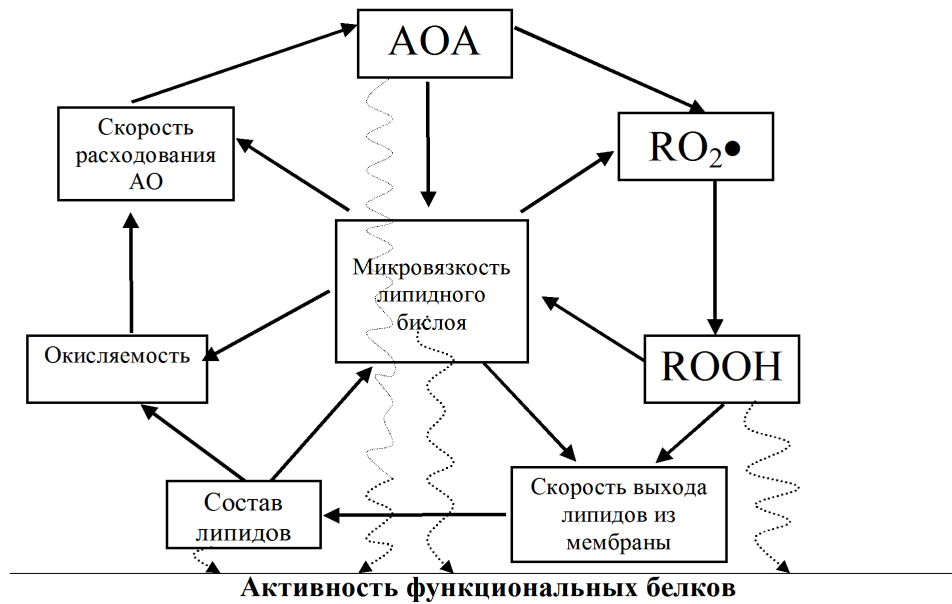


Рисунок 1.1. Схема физико-химической регуляции уровня ПОЛ в липидах биологических мембран [23, 25]

При действии на организм какого-либо повреждающего фактора происходят изменения в этой системе регуляции. Длительные изменения могут быть вызваны, во-первых, действием хронического фактора, который не приводит к разрыву связей в системе регуляции, и тогда после окончания его действия система может возвратиться к норме. Во-вторых, возможны ситуации, когда под действием повреждающего фактора происходит переход на новый уровень регуляции и, наконец, возможны разрывы связей в этой системе, которые не позволяют ей вернуться к норме [24]. В таком случае антиоксиданты могут быть полезны как один из компонентов в комплексной терапии. Подобные закономерности были найдены как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях. Изучение не отдельных изменений в описанной выше системе регуляции, а системы в целом позволяет сказать, когда мы можем обойтись монотерапией антиоксидантами, а когда требуется комплексная терапия, в которой помимо антиоксидантов для лечения необходимы другие биологически активные вещества, имеющие другие мишени. В определенной степени это требование может быть удовлетворено благодаря использованию препаратов, действующих на многие мишени, или же комбинированию средств, обладающих разной биологической активностью [22].

Роль биоантиоксидантов в старении

В настоящее время не существует строго определенной трактовки понятия «старение». Это, в первую очередь, связано не только с тем, что разные организмы стареют по-разному, но и с тем, что изучение данного феномена ведется на разных уровнях организации живого – от молекулярно-генетического до популяционно-видового. Это влечет естественные трудности при попытке сформировать единое понимание проблемы и многообразие теорий, пытающихся объяснить механизмы старения. Тем не менее, определение старения, как увеличения вероятности смерти организма со временем, представляется наиболее ёмким, поскольку справедливо практически для всех индивидуальных механизмов старения. В целом, можно сказать, что процесс старения – это набор эндогенно-обусловленных, прогрессирующих, необратимых изменений, в конечном итоге, приводящих к гибели организма [26].

Существует ряд теорий, которые в качестве причины старения указывают накопление мутаций с увеличением возраста, отмечая при этом значение внешних факторов, другие же считают, что старение – закономерный запрограммированный этап развития организма [27].

Среди множества геронтологических гипотез чрезвычайно широкое экспериментальное подтверждение получило представление о существовании взаимосвязи между продолжительностью жизни и интенсивностью протекания свободно-радикальных реакций. Основы свободно-радикальной теории старения были заложены Д. Харманом в 1956 году. В основе этой теории лежат представления о том, что свободные радикалы, образующиеся в ходе аэробного дыхания, вызывают повреждения окружающих молекул – ДНК, белков и липидов. Харман полагал, что *in vivo* в течение всей жизни эндогенно образующиеся кислородные радикалы являются побочными продуктами работы окислительно-восстановительной цепи митохондрий и вызывают необратимые повреждения макромолекул, оказывающих разрушительное действие на клетку. Таким образом, именно образование активных форм кислорода может рассматриваться, как фактор, обуславливающий старение. Кроме того, свободно-радикальная теория старения опирается на многочисленные экспериментальные свидетельства того, что стареющий организм всегда пребывает в состоянии окислительного стресса. Известно, что окислительный стресс приводит к накоплению поврежденных белков и белков с неправильной конформацией [28], увеличению скорости мутагенеза [26] и воспалению [29]. С другой стороны, известно, что умеренный окислительный стресс необходим клетке, поскольку запускает защитные механизмы, повышающие шансы на выживаемость.

Существует мнение, согласно которому, старение и болезни, вызываемые окислительными повреждениями, являются платой за участие свободных радикалов в осуществлении таких важнейших для организма функций, как рост, развитие, размножение [30]. В свете

представлений о старении как процессе, сопряженном с повышенным риском заболеваемости (в том числе и от инфекций) и, в конечном итоге, смертности организма, большую популярность приобрело обсуждение роли иммунной системы. По данным [31] все клетки иммунной системы подвержены старению, что проявляется в повышенной восприимчивости стареющего организма к инфекциям и, следовательно, увеличению вероятности гибели.

Одним из центральных звеньев иммунной системы являются макрофаги и нейтрофилы, функционирование которых определяется как внутренними событиями в организме, так и факторами внешней среды. Уничтожение чужеродных агентов в этих клетках сопровождается усиленной генерацией АФК, при этом происходит так называемый респираторный взрыв. С увеличением возраста отмечаются нарушения в тонкой и слаженной работе иммунной системы: изменяется соотношение против- и провоспалительных сигнальных молекул, истощается продукция активных форм кислорода и азота в нейтрофилах и макрофагах [32], некорректно или несвоевременно запускается респираторный взрыв. Эти процессы, в свою очередь, вызывают окислительное повреждение компонентов органов и тканей, снижают способность сопротивляться инфекциям [33].

Говоря о старении, в большинстве случаев мы подразумеваем болезни, которые оно сопровождает – это нейродегенеративные заболевания, рак, атеросклероз, диабет, болезни глаз и сердечно-сосудистой системы. Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что прием антиоксидантов помогает снизить риск возникновения этих расстройств [34]. Однако существует ряд ограничений на широкое применение добавок с антиоксидантами. В первую очередь, это недостаток знаний о возможных прооксидантных, оксидантных и антиоксидантных свойствах у таких препаратов. Во-вторых, это наши все более углубляющиеся представления о том, насколько сложна роль свободных радикалов в процессах апоптоза, воспаления, передачи сигнала. И хотя к настоящему моменту не существует подтвержденных свидетельств того, что прием антиоксидантов способен увеличить максимальную продолжительность жизни, тем не менее, можно с уверенностью утверждать, что антиоксиданты способны служить средством профилактики или облегчать течение множества патологий, существенно улучшая качество жизни в преклонном возрасте [35]. В ряде работ показано увеличение средней продолжительности жизни (СПЖ) животных при употреблении синтетических АО. Так, например, прием бутилгидрокситолуола, добавляемого в пищу мышам линии Balb/c, способствовал увеличению средней продолжительности жизни животных на 22% согласно [36], а прием этоксиквина на 19% увеличивал продолжительность жизни мышей линии С3Н [37].

Роль биоантиоксидантов в опухолевом процессе

Известно, что потребление пищи, богатой антиоксидантами (овощей и фруктов), снижает риск развития некоторых видов рака. Результаты эпидемиологических исследований, имеющие целью выявить компоненты пищи, ответственные за такой защитный эффект, демонстрируют обратно-пропорциональную зависимость между уровнем потребления витаминов Е и С, β -каротина и риском развития таких заболеваний, как рак шейки матки, рак легких, рак пищевода, желудка, поджелудочной железы, простаты, яичников, матки, мочевого пузыря [38, 39]. В то же время имеются данные и о стимулирующем действии антиоксидантов на опухолевый рост. Так, например, в ряде работ такое действие обнаружено у витамина С [40, 41]. В связи с этим изучение особенностей применения антиоксидантов при терапии различных опухолевых состояний является актуальной задачей для исследователей.

Процесс перерождения нормальной клетки в трансформированную сопровождается рядом биохимических изменений, итогом которых становится приобретение клеткой ряда новых свойств. Вследствие пониженной потребности в растворимых факторах, инициирующих пролиферацию, на фоне слабой чувствительности к рост-ингибирующим сигналам, отсутствии механизма «контактного торможения» и ряда других факторов трансформированная клетка приобретает способность к неограниченному росту и делению. Кроме того, в раковых клетках ослаблена индукция апоптоза и выражена способность стимулировать неоангиогенез, что является необходимым условием для дальнейшего опухолевого роста [42].

Способность клетки генерировать внутриклеточный ответ на внеклеточные стимулы невозможна без процессов клеточной сигнализации, основными и непосредственными компонентами которых являются АФК. В этом смысле различного рода патологические состояния можно рассматривать как результат неправильной передачи сигнала [43]. Было продемонстрировано, что АФК влияют на экспрессию и количество генов и сигнальные пути передачи сигнала, и, таким образом, могут быть регуляторным инструментом в процессе канцерогенеза [44].

Действие АФК охватывает широкий спектр биологических процессов в клетке, в том числе и имеющих прямое отношение к канцерогенезу. Так, известно, что одним из регуляторов работы генов, вовлеченных в процессы клеточной трансформации, роста и пролиферации, воспаления, ангиогенеза, является транскрипционный фактор *NF- κ B*. Его активацию связывают с действием как внешних (УФ-облучение, химические канцерогены), так и эндогенных стимулов. Будучи вторичными мессенджерами, АФК влияют на активность *NF- κ B* через фактор некроза опухоли и интерлейкин 1 [45].

Окислительное повреждение генетического аппарата клеток свободными радикалами лежит в основе мутагенеза, канцерогенеза и старения. АФК индуцируют в ДНК одно- и двунитевые разрывы, модификацию дезоксирибозы, пуриновых и пиримидиновых оснований, а также вызывают образование поперечных сшивок между основаниями ДНК. К настоящему моменту известно более 100 соединений, образующихся в ходе окислительной модификации ДНК, а сам процесс сопровождает практически все известные виды рака [46]. Это указывает на то, что повреждающее геном действие АФК может быть причиной онкологических заболеваний. Ключевую роль в подавлении опухолевого роста играет транскрипционный фактор p53. Он запрещает процесс деления клеток с поврежденным генетическим материалом или запускает их апоптоз. Мутации гена p53 отмечены более чем у половины видов рака и также могут быть вызваны прямым действием АФК [47].

Биологическое действие антиоксидантов основано не только на их способности захватывать свободные радикалы, но также влиять на пути передачи клеточных сигналов [6]. АО нормализуют регуляцию клеточного цикла, ингибируют пролиферацию и индукцию апоптоза, предотвращают распространение опухоли и ангиогенез, подавляют воспаление, стимулируют активность ферментов детоксикации ксенобиотиков фазы II, и, таким образом, препятствуют канцерогенезу. Было показано, что АО блокируют активацию вышеупомянутого транскрипционного фактора *NF-κB*. Супероксиддисмутаза, утилизируя супероксиданион радикал, подавляет стимулируемый активными формами кислорода клеточный рост. Хорошо известно о связи рака с нарушениями в работе глутатион-зависимых ферментов, в особенности глутатион S-трансфераз [48]. Глутатион S-трансферазы используют глутатион в реакциях инактивации ксенобиотиков, канцерогенов и продуктов, образующихся в ходе окислительного повреждения биомолекул. Кроме того, окислительный стресс приводит к нарушению окислительно-восстановительного гомеостаза клеток, которое обнаружено у множества раковых клеток. Таким образом, изменение окислительно-восстановительного баланса может стимулировать онкогенез. Поэтому в работу АО системы защиты заметный вклад вносит низкомолекулярный белок тиоредоксин, который контролирует поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клетки. Повышенное содержание тиоредоксина обнаруживается при раке желудка, прямой кишки, легких, гепатоцеллюлярной карциноме и др. Следует также отметить роль множества низкомолекулярных антиоксидантов, которые непосредственно взаимодействуют с АФК с образованием менее реакционноспособных молекул [49].

Однако, несмотря на вышеизложенное, в терапии онкологических заболеваний следует с осторожностью применять соединения, обладающие антиоксидантной активностью [50, 51]. Как известно, канцерогенез включает ряд стадий: инициация, промоция, прогрессия. В тканях

организма-опухоленосителя баланс свободных радикалов и антиоксидантов на каждой стадии может существенно различаться [52]. Так, например, в работе [53] показано, что опухолевые ткани содержат более низкие концентрации свободных радикалов в сочетании с относительно высоким содержанием антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, глутатиона) и активностью протеинкиназы С, являющейся ключевым ферментом в процессах злокачественного роста. Поскольку динамика свободнорадикальных реакций в тканях организма-опухоленосителя на разных стадиях канцерогенеза неодинакова, то при назначении антиоксидантной терапии следует учитывать исходный пул антиоксидантов в опухоли.

Механизм действия антиоксидантов на опухолевый процесс заключается в воздействии на определенные стадии канцерогенеза. На стадии инициации антиоксиданты препятствуют образованию канцерогенных соединений из молекул-предшественников. Например, витамины С и Е могут реагировать с нитритом, препятствуя образованию нитрозоаминов *in vivo* [54–56]. Фенольные соединения зеленого чая также ингибируют формирование нитрозаминов в экспериментах *in vivo* [57]. Поскольку высокий уровень свободных радикалов инициирует процесс апоптоза, то излишнее потребление АО может способствовать выживанию поврежденных клеток и их переходу в неопластическое состояние. На стадии прогресса опухоли АО могут стимулировать ее рост, поскольку увеличивают жизнеспособность раковых клеток. Наконец, нельзя не учитывать тот факт, что многие АО приобретают прооксидантную активность при определенной концентрации [51, 58].

Растительные антиоксиданты

При терапии различных заболеваний эффективность использования лекарственных средств часто ограничивается побочными или токсическими эффектами. На пути решения данной проблемы особый интерес представляет поиск малотоксичных натуральных растительных препаратов с определенными свойствами. О лечебных свойствах некоторых растений было хорошо известно еще 5000 лет назад в Китае. Пряности и травы использовались как лекарственные средства в древнем Египте и Сирии, а также в качестве естественных пищевых консервантов в Древнем Риме и Греции [59]. В ряде эпидемиологических исследований было подтверждено, что диета, обогащенная фруктами и овощами, способствует снижению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых видов рака [34, 60]. Известно, что лекарственные свойства многих препаратов растительного происхождения, используемых в народной медицине, обусловлены наличием в них органических и неорганических соединений с различными видами биологической активности, в том числе с антиоксидантными свойствами. К таким соединениям относятся каротиноиды, флавоноиды,

антоцианы, фенольные кислоты, кумарины, танины, а также некоторые металлы Mn, Cu, Zn [61–65].

Интерес к изучению и применению веществ натурального происхождения за последние годы резко вырос. В отличие от синтетических такие препараты имеют существенно меньше побочных эффектов, часто они проявляют выраженное биологическое действие при более низких концентрациях из-за присутствия натуральных веществ-синергистов [65]. Биологически активные соединения растительного происхождения чрезвычайно разнообразны по химической структуре, исследование их свойств является актуальной задачей при производстве продуктов функционального питания (Таблица 1.2).

Использование антиоксидантных препаратов показано при профилактике многих заболеваний, а их применение в период интенсивной терапии может усилить эффективность действия некоторых лекарств. Как известно, большинство синтетических антиоксидантов являются структурными аналогами природных молекул, и в основе их действия лежат одни и те же механизмы. Исходя из этого, следует признать вполне оправданным регулярный прием препаратов, содержащих природные АО для повышения АО статуса организма и снижения опасности возникновения свободнорадикальных патологий.

Таблица 1.2.

Примеры физиологически активных растительных соединений и спектр их биологического действия [66]

Биоактивные соединения растений	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Каротиноиды	+		+		+					
Флавоноиды	+		+	+	+	+	+		+	
Полифенолы	+	+	+	+	+	+	+		+	
Эфирные масла	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Фитиновая кислота	+		+		+			+	+	
Пищевые волокна	+				+			+	+	+

A - антиканцерогенное
 B - антимикробное
 C - антиоксидантное
 D - противотромбозное
 E - иммуномодулирующее

F - противовоспалительное
 G - регуляция кровяного давления
 H - понижение уровня холестерина
 I - понижение уровня глюкозы в крови
 J - улучшение пищеварения

Источниками природных антиоксидантов являются травы, корни, пряности, вытяжки и экстракты из различных частей растений (Таблица 1.3). Такие растения и препараты из них содержат большое число различных биологически активных веществ, включая антиоксиданты, к которым относятся некоторые из витаминов, полифенолы – флавоноиды, каротиноиды, а также эфирные масла.

Таблица 1.3.

Содержание антиоксидантов в некоторых травах и пряностях [67]

	Содержание антиоксидантов, ммоль/100 г
Душистый перец (высушенный, измельченный)	100,4
Бasilik (высушенный)	19,9
Лавровые листья (высушенные)	27,8
Корица (палочки и кора)	26,5
Корица (высушенная, измельченная)	77,0
Гвоздика (высушенная, цельная и измельченная)	277,3
Укроп (высушенный, измельченный)	20,2
Эстрагон (высушенный, измельченный)	43,8
Имбирь (высушенный)	20,3
Листья мяты (высушенные)	116,4
Мускатный орех (высушенный, измельченный)	26,4
Орегано (высушенный, измельченный)	63,2
Розмарин (высушенный, измельченный)	44,8
Шафран (высушенный, измельченный)	44,5
Шафран (высушенные рыльца пестиков)	17,5
Шалфей (высушенный, измельченный)	44,3
Тимьян (высушенный, измельченный)	56,3

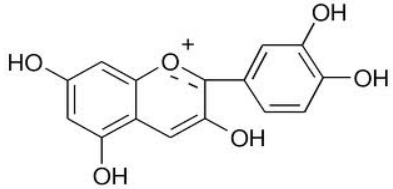
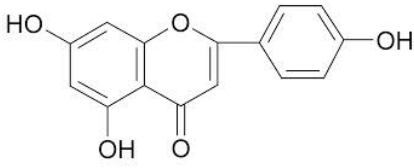
Флавоноиды являются фенолами растительного происхождения. Они принадлежат к соединениям С₆-С₃-С₆ ряда, т.е. состоят из 2-х бензольных колец, соединенных 3-х углеродным фрагментом. В растениях флавоноиды встречаются в свободной форме в виде агликонов, в форме гликозилированных или ацилированных производных или же в виде олигомерных полимеризованных структур [68–70]. Наличие связей, возникающих между

гидроксильными группами флавоноидов и одним или несколькими остатками сахаров, обуславливает значительное структурное разнообразие (известно более 6 тыс. флавоноидов) соединений данной группы. По степени окисленности хромонаового цикла выделяют несколько классов флавоноидов (Таблица 1.4).

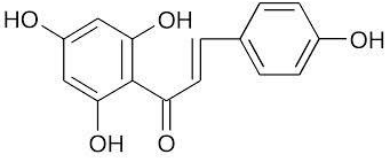
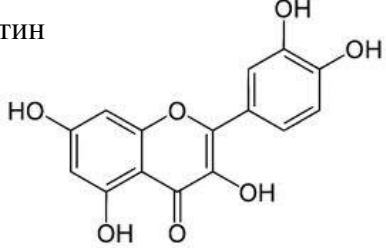
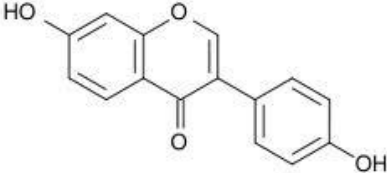
Флавоноиды содержатся практически в любом растении. Основными источниками флавоноидов в пище являются: зеленый чай, какао, мед, фрукты (яблоко, груша, абрикос, слива, персик, цитрусовые), ягоды (ежевика, смородина, черника, клюква, малина, вишня, клубника), овощи (цветная капуста, краснокочанная и белокочанная капуста, брокколи, репа, лук, томат, морковь, перец сладкий), травы (петрушка, укроп), бобы, орехи [71].

Таблица 1.4.

Примеры, структурное разнообразие и источники флавоноидов [72]

Класс флавоноидов	Примеры	Пищевой источник	Химическая структура
Антоцианины	Цианидин, пеларгонидин, пеонидин	Баклажан, черная смородина, черника, ежевика	Цианидин 
Флаван-3-олы, процианидины	Катехин, эпикатехин, эпигаллокатехин	Шоколад, зеленый чай, фасоль, вишня	Эпикатехин 
Флавоны	Апигенин, лютеолин	Петрушка, сельдерей, стручковый перец	Апигенин 

Продолжение Таблицы 1.4.

Флаваноны	Гиспередин, нарингенин, эриодиктиол	Апельсиновый сок, виноградный сок, лимонный сок	Нарингенин 
Флавонолы	Кверцетин, кемпферол, мирицетин	Лук, яблоки, капуста листовая, лук- порей	Кверцетин 
Изофлавоны	Генистеин, даидзеин, глицитеин	Соевая мука, соевые бобы, соевое молоко	Генистеин 

Содержание флавоноидов и фенольных соединений в водных экстрактах часто употребляемых трав и пряностей представлено в Таблице 1.5. Функции флавоноидов в растениях разнообразны. Например, флавоноиды принимают участие в процессе фотосинтеза, защите растений от ультрафиолета, в образовании суберина и лигнина. Они имеют огромное значение для защиты растений от инфекций и травоядных животных, обеспечивают взаимодействие с насекомыми-опылителями [73]. В различных растениях содержание флавоноидов варьирует от 0,5% до 20%.

Разнообразие химической структуры флавоноидов определяет богатство биологических свойств. Многочисленные исследования подтвердили наличие антиэстрогенной и эстрогенной активности таких флавоноидов, как генистеин, даидзеин, апигенин, кемпферол, нарингенин [74].

Показано положительное действие флавоноидов в отношении болезни Альцгеймера [75, 76], сердечных [77, 78] и сосудистых заболеваний [79]. Флавоноидные соединения обладают низкой токсичностью и используются в медицине в качестве витаминов (рутин) или БАДов (кверцетин, диквертин, катехины чая и др.). Эпигаллокатехин галлат, имеющий фенольную природу, является ключевым антиоксидантным соединением зеленого чая, его защитное

действие было продемонстрировано в отношении таких хронических нейродегенеративных расстройств, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, амиотрофический латеральный склероз *in vitro* и *in vivo* [80, 81]. Кверцетин, в большом количестве содержащийся в яблоках, также успешно применяется в качестве нейропротекторного средства [82]. Есть данные о способности флавоноидов регулировать экспрессию генов через взаимодействие с внутриклеточными сигнальными молекулами (протеинкиназами). Известно, что ингибирование протеинкиназ благотворно сказывается на течении нейродегенеративных, воспалительных процессов, а также процессов опухолевого роста [83]. Кроме того, к механизмам, обеспечивающим действие многих флавоноидов на стадии инициации и промоции канцерогенеза, относят снижение экспрессии мутантного белка p53, остановку клеточного цикла, проапоптотическую активность, ингибирование тирозинкиназ и белков теплового шока, способность связываться с рецепторами к эстрогенам, ингибировать ангиогенез, подавлять экспрессию Ras белков [84, 85].

Таблица 1.5.

Общее содержание фенольных соединений (ФС) и флавоноидов (Ф) в некоторых травах и пряностях [86]

Тривиальное название	Ботаническое название	Общее содержание ФС, мг катехин эквивалента/г экстракта \pm SD (n=6, p<0,05)	Общее содержание Ф, мг кверцетин эквивалента/г экстракта \pm SD (n=6, p<0,05)
Розмарин	<i>Rosmarinus officinalis</i>	42,58 \pm 1,01	269,84 \pm 6,50
Орегано	<i>Origanum vulgare</i>	23,36 \pm 0,93	156,93 \pm 9,36
Тмин	<i>Carum carvi</i>	9,92 \pm 0,11	45,01 \pm 2,27
Гвоздика	<i>Syzygium aromaticum</i>	108,28 \pm 7,11	75,97 \pm 0,01
Куркума	<i>Curcuma longa</i>	58,28 \pm 3,55	324,08 \pm 4,34
Тимьян	<i>Thymus vulgaris</i>	7,78 \pm 0,31	14,25 \pm 0,54
Базилик	<i>Ocimum basilicum</i>	20,25 \pm 0,85	131,60 \pm 17,83
Майоран	<i>Maiorana hortensi</i>	20,44 \pm 0,62	157,73 \pm 7,06
Мускатный	<i>Myristica fragrans</i>	6,50 \pm 0,32	7,67 \pm 0,83
Фенхель	<i>Foeniculum vulgare</i>	9,36 \pm 0,21	44,76 \pm 2,32
Кориандр	<i>Coriandrum sativum</i>	9,22 \pm 0,09	3,38 \pm 0,09
Чабер	<i>Satureja</i>	48,07 \pm 1,61	35,19 \pm 5,84
Кумин	<i>Cuminum cyminum</i>	10,17 \pm 0,68	101,34 \pm 4,08

Однако, несмотря на все многообразие фармакологических эффектов ключевое свойство флавоноидов – их антиоксидантное действие. Именно данный вид биологической активности обуславливает универсальность их действия на факторы патогенеза практически всех заболеваний, опосредованных избыточной продукцией свободных радикалов. Антиоксидантное действие флавоноидов обусловлено не только их способностью непосредственно «захватывать» свободные радикалы, а также металл-хелатирующей активностью [87] и влиянием на уровень эндогенных антиоксидантов. Полифенолы индуцируют такие ферменты как глутатионпероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза, ингибируют экспрессию ксантиноксидаз [88].

Тем не менее, флавоноиды не получили широкого применения в клинической практике. Существенным ограничением явилась их низкая биодоступность: большая часть флавоноидов, потребляемых с пищей (75-99%), либо не всасывается в желудочно-кишечном тракте, либо выделяется с желчью, либо подвергается метаболизму ферментами микрофлоры толстой кишки или тканей человека [89, 90].

Каротиноиды принадлежат к классу жирорастворимых натуральных соединений, найденных в растениях, водорослях и фотосинтезирующих бактериях. История каротиноидов начиналась в 1831 году, когда Г.В.Ф. Вакенродер впервые изолировал пигмент из моркови и назвал его каротин [91]. Затем было обнаружено, что каротины широко распространены в растениях [92]. Шестью годами позднее, в 1837 г., Й.Я. Берцелиус назвал желтый пигмент осенних листьев ксантофиллом. В 1910 году русский биохимик М.С. Цвет назвал каротиноидами всю группу подобных пигментов [93]. Г.Г. Стрэйн (1938 г.) предложил называть каротинами чистые углеводороды, не имеющие кислородсодержащих функциональных групп, а ксантофиллами – оксигенированные производные углеводородов [94]. По химической природе каротиноиды относятся к классу *терпеноидов*, который включает также эфирные масла, фитогормоны, стероиды, сердечные гликозиды, жирорастворимые витамины, млечный сок. Углеводородный скелет каротиноидов, как и всех терпеноидов, сформирован из молекул изопрена [95]. Каротиноиды относятся к тетратерпенам; они состоят из длинных ветвящихся углеводородных цепей, содержащих несколько сопряженных двойных связей, заканчивающихся на одном (γ -каротин) или обоих концах (β -каротин) кольцевой циклической структурой — иононовым кольцом (Рисунок 1.2). Каротиноиды не растворимы в воде, однако хорошо растворяются практически во всех органических растворителях.

Каротиноиды являются самыми распространенными в природе пигментами и окрашивают части растения в цвета от желтого до красного. Наиболее богаты каротиноидами желто-оранжевые овощи (морковь, тыква, абрикосы, хурма), а также зеленый лук, шпинат. Функции каротиноидов у растений чрезвычайно многообразны: участие в процессах фотосинтеза, защита от ультрафиолетового излучения, торможение свободно-радикальных реакций благодаря наличию сопряженных двойных связей. Обнаружение каротиноидов в тканях животных положило начало исследованию активности пигментов, в частности, была показана способность β -каротина (провитамин А) превращаться в витамин А [96]. Позднее провитаминная активность была найдена у многих каротиноидов, например, у криптоксантина [97].

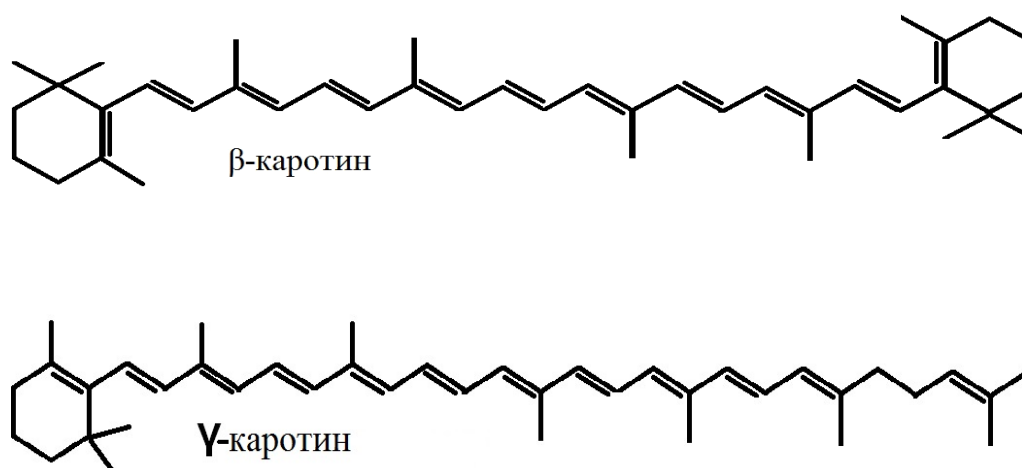


Рисунок 1.2. Типичная структурная формула некоторых каротиноидов

Была доказана способность определенных каротиноидов ингибировать опухолевый процесс [98, 99] и снижать риск развития диабета II типа [100]. Во многих исследованиях было подтверждено сильное антиоксидантное действие каротиноидов. Однако в последние десятилетия была также обнаружена и их прооксидантная активность. Так, например, было показано что β -каротин и некоторые другие каротиноиды обладают антиоксидантным действием лишь в присутствии коантиоксидантов, однако при истощении последних начинают проявлять прооксидантные свойства [58].

Эфирные масла. Во многих растениях в течение периода вегетации происходит синтез и накопление смесей низкомолекулярных соединений различного состава, которые служат для защиты от инфекций, терморегуляции, а характерный для каждого масла запах привлекает или

отпугивает насекомых. Эфирные масла представляют собой летучие бесцветные или желтоватые жидкости, хорошо растворимые в спирте и органических растворителях, они смешиваются с водой в ограниченной степени [101]. В настоящее время достаточно полно изучен состав многих эфирных масел. Как правило, они являются сложной многокомпонентной смесью моно- и сесквитерпеноидов: углеводов, спиртов, альдегидов, кетонов, сложных эфиров, производных фенолов. Также найдены катаболиты жирных кислот, включая продукты липооксигеназного пути, ароматические углеводороды (бензоиды и фенилпропаноиды), C5-разветвленные соединения, а также различные азот- и серосодержащие вещества [102]. Летучие соединения терпенового ряда синтезируются растениями из 2-3 молекул изопрена, это моно- и сесквитерпены. Благодаря наличию в составе эфирных масел различных реакционно-способных соединений они обладают широким спектром биологической активности и часто ответственны за фармакологические свойства препаратов из лекарственных растений, а также самих растений [103].

Одним из важнейших свойств ЭМ является их антиоксидантная активность, которая была установлена для большого числа ЭМ во множестве работ. Однако большинство исследований АО свойств ЭМ проведено либо в модельных системах, либо исследованы свойства одного из основных компонентов того или иного ЭМ. Крайне важно, чтобы АО свойства ЭМ проявлялись не только в модельных системах, но и в живых организмах, то есть, чтобы ЭМ были биоантиоксидантами. Сложность изучения БАО свойств ЭМ *in vivo* связана с тем, что различные соединения, входящие в его состав, обладают разными химическими и биологическими свойствами, начиная с различий по скорости всасывания, транспорта, экскреции, способности к проникновению и накапливанию в клетке, и заканчивая их непосредственным влиянием на окислительный стресс в различных клеточных компартментах. С одной стороны, это недостаток, с другой – преимущество, так как по сравнению с индивидуальным веществом, многокомпонентный препарат имеет сразу несколько активных соединений, которые могут оказывать синергетическое влияние на активность друг друга. Это приводит к потенцированию суммарного эффекта, что невозможно в случае однокомпонентного препарата.

В последнее время все более актуальными становятся исследования в области антиоксидантной терапии, снижающей интенсивность окислительного стресса, связанного с различными заболеваниями и помогающей улучшить общее состояние или хотя бы смягчить действие повреждающих факторов. В связи с этим все больший интерес вызывает использование ЭМ как эффективных АО в живых системах. Эта проблема крайне важна, так как многие пряные растения – источники эфирных масел – используются в питании и поэтому

могли бы играть важную роль в профилактике и лечении тех патологий, основой которых является окислительный стресс, возникающий при дисбалансе образования и удаления радикальных метаболитов. Несмотря на важность таких исследований, способность эфирных масел быть антиоксидантами в системах *in vivo* изучена недостаточно.

В ряде работ было установлено, что прием ЭМ, или экстрактов пряно-ароматических растений, или измельченных пряностей сопровождался снижением интенсивности ПОЛ в органах и тканях лабораторных животных, а также приводил к увеличению активности антиоксидантных и защитных ферментов [104–108]. Эти данные доказывают, что ЭМ являются эффективными биоантиоксидантами. Так, было проведено изучение влияния эфирных масел орегано, гвоздики или смеси масла лимона и экстракта имбиря на антиоксидантный статус органов интактных мышей линии Balb/c. Найдено, что эфирные масла, принимаемые мышами в течение 6 месяцев даже в очень малых дозах (около 300 нг в сутки), проявили себя *in vivo* как эффективные биоантиоксиданты. Все изученные ЭМ снижали интенсивность ПОЛ в мембранах эритроцитов, это приводило к увеличению устойчивости мембран к спонтанному гемолизу, снижению их микровязкости, сохранению структурной целостности и функциональной активности. Эфирные масла существенно снижали интенсивность ПОЛ в печени и мозге мышей, увеличивали устойчивость липидов печени и мозга к окислению и повышали активность антиоксидантных ферментов печени. В эритроцитах самым активным биоантиоксидантом было эфирное масло гвоздики, в печени и мозге – смесь ЭМ лимона и экстракта имбиря [108]. В другом исследовании [109] самцов белых крыс линии Wistar содержали на рационе с высоким содержанием жиров и добавлением 10% порошка семян черного кардамона или 10% порошка коры корицы в течение 90 дней, что приводило к существенному снижению концентрации ТБК-активных продуктов в тканях сердца опытных групп. Кроме того, значительно увеличивались активности антиоксидантных ферментов, в том числе каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионтрансферазы в тканях печени и сердца по сравнению с контрольной группой. Эти ферменты помогают поддерживать необходимый уровень глутатиона, участвующего в защите клеточных мембран от окислительного повреждения. Порошок коры корицы подавлял в пробирке рост бактерий *H. pylori*, который является одним из факторов возможного развития рака желудка, лимфомы слизистой оболочки желудка и, возможно, рака поджелудочной железы, что безусловно привлекло внимание к возможности использования этой специи в качестве противоракового препарата [110, 111].

Биоантиоксидантные свойства были найдены и у семян кориандра. Так, в работе [104] было показано, что прием в течение 12 недель самцами крыс линии Wistar пищи, содержащей 10% порошка семян кориандра, приводил к активации антиоксидантной системы. В случае

приема мышами линии Swiss 160 мг семян кориандра на грамм корма наблюдалась индукция ГТ в диапазоне от 20% до 37% в зависимости от вида ткани [112]. В другом исследовании [105] у мышей той же линии, которые питались кормом, содержащим ЭМ кориандра (10 мкл ЭМ кориандра в день в течение 2 недель), наблюдалось примерно двукратное повышение активности ГТ.

Весьма эффективными биоантиоксидантами являются препараты из имбиря, в которых самым активным компонентом был гингерол. При его воздействии на культуру человеческих кератиноцитов происходило снижение интенсивности образования внутриклеточных АФК [113]. В нескольких работах были опубликованы данные, свидетельствующие о том, что имбирь подавлял интенсивность процессов ПОЛ [114–118]. Содержание крыс линии Wistar на диете, содержащей 0,5-5% имбиря в течение 1 месяца, привело к значительному увеличению активности нескольких антиоксидантных ферментов печени, в том числе СОД (76-141%), каталазы (37-94%) и ГП (11-30%) [119]. Прием имбиря ингибировал процессы перекисного окисления липидов и белков, свидетельством чего являлось снижение концентрации ТБК-АП в тканях печени и почек крыс опытных групп. Корень имбиря по содержанию общего количества АО (3,85 ммоль/100 г) уступает лишь гранату и некоторым видам ягод [120]. Употребление крысами имбиря, как сообщалось в работе [115], ингибировало процессы ПОЛ и приводило к норме активность АО ферментов (СОД, ГТ, ГП, глутатионредуктазы и каталазы). Экстракт имбиря проявлял и радиозащитные свойства в эксперименте с мышами, подвергнутыми воздействию гамма-излучения. Подобный эффект, по предположению авторов, был связан со снижением интенсивности процессов ПОЛ и поддержанием достаточного уровня глутатиона [121].

Следует отметить, что анализ имеющихся литературных данных показал, что пряно-ароматические растения, их экстракты и ЭМ наряду с антиоксидантными свойствами проявляют широкий спектр других видов активности, в том числе и противораковую. Так, было показано [122–124], что экстракт и ЭМ душистого перца, в основном за счет высокого содержания эвгенола (60-75%), проявляли высокую АО активность. Кроме того, в экспериментах по подавлению микробного роста [125] душистый перец не уступал по эффективности чесноку и луку. В одной из работ [123] было найдено, что потребление суспензии душистого перца крысами в дозе 500 мг/кг массы тела значительно ингибировало развитие каррагинан-индуцированного отека лапы. При добавлении экстракта душистого перца в среду культивирования жизнеспособность клеток рака простаты (LNCaP клетки) сокращалась примерно на 50%, однако культуры человеческих клеток рака простаты линии (DU145) или карциномы эпителия шейки матки (HeLa) были нечувствительны к нему [126]. Противораковые

свойства душистого перца могут отчасти быть связаны с его способностью модулировать активность цитохрома P-450 (CYP), влияя тем самым на биоактивацию канцерогенеза [122]. Но это лишь одна из гипотез, так как механизмы, посредством которых душистый перец подавляет клеточный рост, остаются на сегодняшний день в значительной степени неясными.

Авторы работы [107] обнаружили, что эфирное масло и олеорезин тмина по своей антирадикальной активности в реакции с дифенилпикрилгидразилом (DPPH) превосходили бутилгидрокситолуол (BHT) и бутилгидроксианизол (BHA). Другими авторами [127] было исследовано влияние экстракта семян тмина на процесс мутагенеза, индуцированного N-метил-N-нитро-N'-нитрозогуанидином (MNNG) у штаммов *S. Typhimurium*, которые дефицитны по MGMT ДНК. Результаты показали, что тмин, проявляя антимуtagenную активность, непосредственно не инактивирует MNNG, и его действие, возможно, обусловлено вовлечением каких-либо косвенных механизмов. Изучение потенциальных противоопухолевых свойств тмина также проводили и в моделях на животных. В работе [128] рассмотрели влияние приема ЭМ тмина на развитие кожных опухолей, индуцированных диметилбензантраценом (DMBA) у самок мышей линии Balb/c. В группах, которых содержали на рационе, содержащем 3% ЭМ тмина в течение 23 недель с момента начала опухолевого роста, уменьшилось количество мышей с папилломами ($p < 0,001$), количество папиллом у мышей ($p < 0,0001$), а также средний размер папилломы ($p < 0,0001$). Количество случаев развившихся карцином в опытных группах было значительно меньше по сравнению с контрольными.

Было показано, что экстракты черного кардамона (*Amomum subulatum*) имели высокую антирадикальную активность в модельной системе с ДФПГ радикалом [129]. В состав экстрактов входили несколько фенольных соединений, таких как протокатехиальдегид, протокатеховая кислота, 1,7-бис-(3,4-дигидроксифенил)-гепта-4,6(Е,Е)-диен-3-он и 2,3,7-тригидрокси-5-(3,4-дигидрокси-эстирил)-6,7,8,9-тетрагидро-5Н-бензоциклопентен. В работе [105] была установлена способность ЭМ кардамона ингибировать химически индуцированный канцерогенез. Прием по 10 мкл в день ЭМ кардамона в течение 2 недель вызывал снижение содержания в печени цитохрома P-450 у белых мышей линии Swiss на 30% и увеличение активности глутатион-S-трансферазы в печени. Эти наблюдения позволяют предположить, что потребление ЭМ кардамона влияет на активность ферментов, связанных с метаболизмом ксенобиотиков, и поэтому может иметь преимущества в качестве противоопухолевого препарата. Кардамон также проявлял высокую биологическую активность в случае развития азоксиметан-индуцированного канцерогенеза толстой кишки в силу его противовоспалительной, антипролиферативной и проапоптотической активностей. Также в

работе [106] было найдено, что прием водных суспензий кардамона приводил к повышению активности АО ферментов и снижению интенсивности процессов ПОЛ.

В нескольких экспериментах *in vivo* были изучены возможные механизмы использования препаратов имбиря в профилактике рака. Например, самцам крыс линии Wistar вводили N-бутил-N-(4-гидроксibuтил)-нитрозамин (BNN) и урациловую соль с целью вызвать опухоли, напоминающие человеческие папиллярные уротелиальные неоплазии. Крыс содержали на общевиварном рационе с добавлением 1% экстракта имбиря в течение 26 недель. Результаты эксперимента свидетельствовали о значительном уменьшении случаев уротелиальных поражений по сравнению с контрольной группой. [130]. Однако, имбирь эффективен не во всех случаях, о чем свидетельствует отсутствие защиты от пролиферативного поражения в мочевом пузыре мышей линии Swiss, которых кормили кормом, содержащим 1% или 2% экстракта имбиря, и которых также подвергали воздействию BNN [131].

Ряд данных свидетельствует о том, что экстракт розмарина, или его индивидуальные компоненты, способны замедлять процесс развития химически индуцированных опухолей. Например, местное применение экстракта розмарина замедляет развитие и рост DMBA-индуцированных опухолей молочных желез и опухолей кожи у крыс [132, 133]. Подобные результаты были получены и для карнозола и урсоловой кислоты [132], они способны подавлять пролиферацию различных раковых клеточных культур: NCI-H82 (человеческий мелкоклеточный рак легких), DU145 (человеческий рак простаты), Нер-3В (карцинома печени человека), К-562 (человеческий хронический миелолейкоз), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), РС-3 (аденокарцинома предстательной железы человека) и MDA-MB-231 (человеческая аденокарцинома молочной железы) [134].

Как правило, тот или иной вид биологической активности ЭМ определяется наличием в нем определенных соединений, от их содержания и содержания других сопутствующих веществ зависит биологическое действие ЭМ. Для некоторых компонентов эфирных масел в последние годы изучена биологическая активность в различных модельных системах, включая клеточные, реже на лабораторных животных. Такие данные получены для миристицина, гераниала, гераниола, лимонена, периллового спирта, α -бисаболола α -куркумена, 1,8-цинеола, терпинен-4-ола, γ -терпинена, фенолов: эвгенола, карвакрола, тимола и тимохинона и др.

Миристицин является ключевым компонентом, ответственным за аромат эфирных масел мускатного ореха и мациса. В результате исследований установлено, что это соединение является перспективным химиотерапевтическим агентом. Он способен защищать печень от повреждений, вызванных липополисахаридом и D-галактозамином [135], активировать

фермент-детоксикант глутатион-S-трансферазу [136], ингибировать онкогенез в тканях мышей [137], индуцировать апоптоз в клетках нейробластомы человека SK-N-SH [138].

Гераниаль, транс-изомер цитраля, является индуктором π -класса глутатион-S-трансфераз. Поэтому цитраль можно применять в целях профилактики раков, связанных с недостатком глутатион-S-трансферазной активности, таких как рак кожи [139] и рак толстой кишки [140]. Цитраль в большом количестве присутствует в растении и в эфирном масле лемонграсса, содержится в кожуре и масле лимона.

Гераниол – монотерпеновый спирт, продукт окисления гераниаля, содержится в эфирных маслах примулы и некоторых видах герани, способен повышать эффективность действия флуороурацила на раковые клетки [141].

D-лимонен является компонентом многих эфирных масел. Так, в эфирном масле кожуры цитрусовых (лимона, апельсина, грейпфрута) его содержание составляет до 95%. D-лимонен (20-40%) также содержится в эфирных маслах мяты, укропа, тмина, фенхеля и др. [142]. По данным [143], это соединение имело выраженные химиотерапевтические свойства в предклинических экспериментах на модели гепатоцеллюлярной карциномы. В основе возможного механизма такого действия может лежать индукция специфических изозимов CYP2C и CYP 2B1 цитохрома P450 [144]. D-лимонен также обладает химиофилактическим действием и в отношении рака кожи [145]. Показана антиангиогенная и проапоптотическая активность d-лимонена, а также его способность дозозависимым образом индуцировать образование апоптотических телец в экспериментах на клетках рака желудка BGC-823, причем эффективность d-лимонена возрастала в сочетании с 5-флуороурацилом [146]. Введение d-лимонена в концентрации 1-2% в корм крыс Sprague-Dawley приводило к сокращению числа и средней площади очагов гепатоцеллюлярной карциномы, индуцированной N-нитрозоморфолином [147]. Кроме того, d-лимонен увеличивал выживаемость мышей с лимфомой и модулировал иммунный ответ [148].

Перилловый спирт является гидроксильным производным d-лимонена. Это соединение обладает рядом очень интересных свойств. Оно препятствовало росту новых кровеносных сосудов в экспериментах *in vivo*, обладало способностью избирательно модулировать высвобождение двух ключевых регуляторов ангиогенеза *in vitro*: фактора роста эндотелия сосудов и ангиопоэтина 2. В раковых клетках перилловый спирт ингибировал выработку фактора роста эндотелия сосудов, а в клетках эндотелия стимулировал экспрессию ангиопоэтина, что подавляло образование новых кровеносных сосудов и индуцировало регрессию уже существующих. Эти данные позволяют считать перилловый спирт эффективным средством терапии ангиогенез-зависимых патологий [149]. Перилловый спирт сам по себе или в

комплексе с перилловой кислотой (основной метаболит периллового спирта в организме) стимулировал апоптоз в опухолях различных типов, ингибировал в них пролиферацию клеток, а также снижал устойчивость опухолей к химио- и радиотерапии [150–152]. Однако, несмотря на очевидную противораковую активность периллового спирта *in vitro*, в клинических испытаниях его пероральный прием не подтвердил наличия противоопухолевой активности [153, 154]. Перилловый спирт в небольших количествах встречается в эфирных маслах мяты, лаванды, периллы, лемонграсса. Путем микробиологической биотрансформации перилловый спирт также может быть получен из d-лимонена [155].

α-Бисаболол – сесквитерпеновый спирт, основной компонент эфирного масла ромашки. Показана способность α-бисаболола индуцировать апоптоз в злокачественных клетках глиомы [156].

Эвкалиптол (1,8-цинеол) в значительных количествах обнаружен в эфирных маслах эвкалипта, кардамона, розмарина, лавра. Эвкалиптол индуцировал фрагментацию ДНК в клетках лейкемии человека HL-60, однако этот эффект не был воспроизведен в случае с клетками рака желудка человека КАТО III [157].

Терпинен-4-ол – монотерпеновый спирт, в значительных количествах присутствующий в эфирном масле чайного дерева. В работе [158] показана способность индуцировать каспаз-зависимый апоптоз в клетках меланомы человека M14 WT. Авторы предполагают, что действие терпинен-4-ола опосредовано взаимодействием с плазматической мембраной и последующей реорганизацией мембранных липидов.

γ-Терпинен – монотерпеновый углеводород, присутствующий в эфирных маслах чайного дерева, кожуры некоторых цитрусовых (бергамот, мандарин, лимон), в ЭМ черного перца и кориандра [159, 160]. Этот монотерпеновый моноциклический углеводород наряду с α-терпиненом и α-терпиноленом эффективно ингибирует окисление липопротеинов низкой плотности даже на стадии продолжения цепи [161].

Особое место в ряду биологически активных эфирных масел занимают эфирные масла лука и чеснока. В отличие от остальных, эфирные масла этих растений состоят из летучих ***диалкилполисульфидов***, веществ профилактического и терапевтического значения. Эти соединения образуются ферментативно в момент измельчения лука или чеснока из предшественников – S-алкилцистеинсульфоксидов. В луке диалкилполисульфиды содержат в качестве алкилов пропильный и пропенильный заместители, в чесноке – в основном аллильный заместитель. Эффективность эфирного масла чеснока и его индивидуальных составляющих в отношении различных типов канцерогенеза подтверждена множеством исследований. Показана способность сероорганических соединений модулировать ферменты детоксиканты фазы I и

фазы II [162]. Эфирное масло чеснока и его основные составляющие диаллилдисульфид и диаллилтрисульфид увеличивают активность глутатион-S-трансфераз класса π – ферментов-детоксикантов фазы II, имеющих отношение к развитию рака яичников [163] и рака толстой кишки [140, 164]. Защитное действие серосодержащих органических соединений обусловлено изменением ферментного метаболизма при канцерогенезе, подавлением роста опухоли за счет остановки клеточного деления и индукции апоптоза, торможением ангиогенеза в опухоли, стимулированием иммунной системы, антиоксидантным действием [164–166].

Некоторые ЭМ содержат фенольные соединения в качестве основных компонентов, например, *эвгенол*. Он является эффективным антиоксидантом, способен значительно (на 50-100%) ингибировать окисление липопротеинов низкой плотности [167].

Среди множества природных антиоксидантов большой интерес представляют эфирные масла растений семейства Губоцветных (*Labiatae*) или, как его еще называют, Яснотковых (*Lamiaceae*). Выдающимися антиоксидантными свойствами обладают эфирные масла орегано, чабера, тимьяна, некоторых видов монарды и чабрецов, содержащие в большом количестве производные фенола со структурой терпенов - тимол, карвакрол и тимохинон. Показано, что противовоспалительной активностью обладают такие компоненты ЭМ, как 1,8-цинеол, борнеол, камфора [168].

Тимохинон был найден вместе с тимогидрохиноном в эфирном масле *Monarda fistulosa* и *Mosla grosserrata*. Высокое содержание тимохинона (до 60%) обнаружено в CO₂ – экстракте черного тмина (*Nigella sativa*). В этом экстракте предполагается наличие и сложного комплекса тимохинона и гидрохинона – тимохингидрона. Тимохинон – кристаллическое вещество с запахом хинона и тимола, на свету медленно превращается в дитимохинон. Найдено, что эти соединения обладают антиоксидантными свойствами (прооксидантными – в случае высоких концентраций), а также способны защищать печень мышей от химически-индуцированного повреждения [169] Цитопротекторное и антиоксидантное действие тимохинона показано также в работе [170]. Обнаружено, что тимохинон в эфирном масле черного тмина способен снижать концентрацию холестерина и триглицеридов в плазме крови.

Тимол присутствует в эфирных маслах некоторых видов базилика, душицы, чабреца, монарды и ажгона. Эфирное масло тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgare L.*) содержит до 70% тимола. Это соединение является кристаллическим веществом, обладает выраженной антимикробной активностью (выше, чем у фенола), является эффективным антигельминтным средством. Как и другие фенолы, обладает прижигающим действием. Тимол также является эффективным антиоксидантом, ингибирующим окисление липопротеинов низкой плотности [171]. Как известно, накопление окисленных липопротеинов низкой плотности вызывает

атеросклеротические изменения стенки кровеносных сосудов, поэтому препараты с антиоксидантной активностью находят широкое применение в терапии атеросклероза.

Очень часто в растениях вместе с тимолом присутствует его изомер – **карвакрол**. В большой концентрации карвакрол присутствует в эфирных маслах растений рода *Thymus* (чабрец), *Monarda* (монарда), *Satureja* (чабер). В отличие от тимола, карвакрол является жидкостью, он, как и тимол, обладает антимикробным и антигельминтным действием. Изучение свойств этого соединения выявило наличие у него различных видов биологической активности.

Биологическая активность карвакролсодержащих масел. Карвакрол является основным компонентом эфирного масла, получаемого из растения орегано (*Origanum vulgare* spp.), которое принадлежит к семейству яснотковые (*Lamiaceae*) и широко используется в европейской и средиземноморской культуре в качестве пряности. Эфирное масло из орегано и некоторых родственных растений (*Thymbra*, *Satureja*, *Thymus*, *Lippia*) получают перегонкой с водяным паром, при этом его химический состав может в значительной степени варьировать в зависимости от географических, климатических условий, а также от того, какие части растения используются в качестве исходного сырья. При этом содержание основных компонентов эфирного масла орегано – карвакрола и тимола – варьирует в пределах 60– 80% и 0,4– 2,5%, соответственно [172]. Эфирное масло орегано обладает антимикробным [172], цитотоксическим [172], фунгицидным [173], инсектицидным [174, 175], противопаразитическим [176], противовирусным действием [177], антиоксидантной и антирадикальной [178, 179] активностями.

По содержанию основных компонентов весьма близким к маслу орегано является эфирное масло другого представителя семейства *Lamiaceae* – чабера садового. Эфирное масло чабера (*Satureja hortensis*) представляет собой жидкость светло-жёлтого цвета с резким запахом, напоминающим запах тимьяна. Это масло, как и масло орегано, богато карвакролом (42— 63 %), кроме того, содержит ароматический углеводород *p*-метил-изопропилбензол (*p*-цимен) (до 20%) и терпеновые углеводороды (до 40%) [180, 181]. Эфирное масло чабера известно своими антимикробными, противопаразитическими, антиоксидантными, антигенотоксическими, антиноцептивными и противовоспалительными свойствами [182–184].

Считается, что именно высокое содержание карвакрола и его структурного изомера – тимола, обуславливают тот спектр действия, который присущ эфирным маслам орегано и чабера. Химические формулы карвакрола и тимола приведены на Рисунке 1.3. Это фенольные соединения с метильной и изопропильной группами. Тимол отличается от карвакрола лишь

положением ОН группы. Оба вещества способствуют увеличению проницаемости клеточной мембраны.

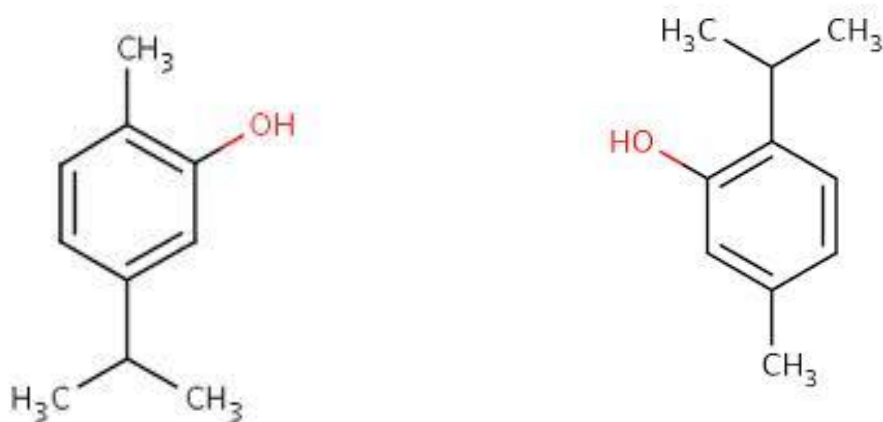


Рисунок 1.3. Структурная формула карвакрола (слева) и тимола (справа)

Биологическое действие эфирных масел основано прежде всего на том, что их компоненты, будучи молекулами малого размера, достаточно легко проникают через кожу, активно всасываются стенками внутренних органов или легко проникают через клеточные мембраны. Предполагается, что механизм действия вдыхаемых или нанесенных на кожу ЭМ основан на их взаимодействии с липофильными фракциями липидных участков плазматической мембраны и изменении активности кальциевых и натриевых ионных каналов клеток. Это взаимодействие зависит от структуры и физико-химических свойств компонентов ЭМ, которые в дальнейшем влияют на функционирование различных мембранных молекулярных структур: транспортных систем, ферментов, ионных каналов или рецепторов [185].

Изучение антимикробных свойств карвакрола позволило предложить следующий механизм его действия на бактериальную клетку [186]. Было показано, что карвакрол, будучи гидрофобным соединением, легко проникает через мембрану, диссоциирует в клетке, связывает ионы калия, снижает рН с 7,1 до 5,8. В виде соли с калием карвакрол выходит из клетки, и содержание калия в клетках уменьшается. Также наблюдается утечка фосфат-ионов. По-видимому, потеря ионов происходит из-за того, что карвакрол формирует каналы в мембране, раздвигая жирнокислотные цепи фосфолипидов. В присутствии карвакрола падает активность цитоплазматических ферментов, изменяется осмотическое давление, нарушается градиент ионов водорода (ΔpH) и электронов ($\Delta\phi$). Карвакрол снижает содержание белка с 12 до 1 ммол в мг за 5 мин. Изменение рН, в свою очередь, ингибирует синтез и увеличивает гидролиз АТФ. В результате микробные клетки погибают. Активная антимикробная концентрация карвакрола

сопоставима с концентрацией, которая используется для придания аромата продуктам – около 15 ppm. [187]. Не исключены и другие механизмы антимикробного действия карвакрола, например по характерному для тимола, который также обладает антимикробным действием, типу. Предполагается, что механизм действия тимола заключается в его гидрофобном связывании с мембранными белками посредством водородных связей. Встраивание тимола в липидный бислой приводит к изменению проницаемости мембраны бактериальной клетки [188].

Интересной проблемой является исследование взаимодействия эфирных масел и их отдельных компонентов. Эфирные масла и/или их смеси могут оказывать нейтральные, аддитивные, синергетические или антагонистические эффекты. Более 100 000 вторичных метаболитов, в том числе 3 000 эфирных масел, синтезируемых в растениях, так или иначе, выполняют функции приспособления к абиотическим факторам окружающей среды или защиты от хищников. Эта система защиты сложилась за миллионы лет эволюции живых существ и является высокоэффективной. Ряд исследований показал, что некоторые эфирные масла обладают большей антибактериальной активностью, нежели смесь, состоящая из их основных компонентов. Это свидетельствует о том, что натуральное ЭМ содержит ряд минорных соединений, возможно не обладающих в отдельном выделенном состоянии высокой биологической активностью, но играющих важную роль в синергизме других компонентов в составе масла. Среди четырех вышеуказанных типов взаимодействия наиболее актуальным является обнаружение синергетических свойств. Способность отдельных компонентов ЭМ оказывать синергетический эффект позволяет использовать вещества в более низких концентрациях или уменьшать длительность их воздействия. Так, например, смесь тимола с карвакролом в соотношении 1:1 позволяет снизить эффективную антимикробную концентрацию на 25% по сравнению с индивидуальными компонентами [189]. Тимол или карвакрол также демонстрируют синергизм в отношении циннамальдегида (коричный альдегид), позволяя последнему легче проникать через клеточную мембрану бактерии *S.typhimurium* [190]. Использование тимола и эвгенола в соотношении 1:4 уменьшает эффективную антимикробную концентрацию индивидуальных соединений на 50%, а комбинация карвакрола с эвгенолом в том же соотношении обеспечивает лишь 25%-ое снижение этого параметра в отношении *E. Coli* [191].

Важным свойством карвакрол-содержащих эфирных масел является их антиоксидантная активность. Это свойство особенно актуально в настоящее время, так как ряд токсикологических исследований показал, что широко используемые синтетические АО, такие как ВНТ и ВНА приводят к появлению и пролиферации раковых клеток у крыс [192, 193].

Поэтому крайне важен поиск натуральных эффективных и безвредных АО, которые способны предохранять организм и клетки от заболеваний, индуцируемых окислительным стрессом, в частности, старением, нейродегенеративными заболеваниями и раком [194]. Было показано, что эфирные масла чабера и орегано снижали окисление липидов, стабилизировали растительные масла при нагревании на воздухе [195]. Тимол и карвакрол ингибировали пероксидное окисление фосфолипидов в липосомах в зависимости от дозы, оба соединения уменьшали окисление лярда при их концентрации в модельной системе 0,1- 0,2% [196, 197].

ЭМ орегано и его основной компонент карвакрол проявляли противораковое действие. Найдено, что ЭМ блокировало ангиогенез *in vitro*, а также ингибировало выживаемость и пролиферацию раковых клеток [198]. Употребление ЭМ орегано увеличивало активность глутатион-S-трансферазы в различных тканях мышей в опытах *in vivo* [199]. Этот фермент обеспечивает детоксикацию химических канцерогенов и играет важную роль в предотвращении канцерогенеза, поэтому увеличение его активности позволяет надеяться на наличие противораковых свойств у ЭМ орегано, которое связывают с карвакролом [200, 201]. Тимол ингибировал деление клеток асцитной саркомы ВР8 *in vitro* [202], а карвакрол и тимол при концентрации 120 мкМ/л обеспечивали 50%-ое ингибирование роста клеток меланомы В16(F10) [203]. Прием растительного масла с добавлением 100 мг/кг/сут карвакрола в течение 7 дней уменьшал размеры опухолей после подкожного введения клеток мастоцитомы Р-815, а также увеличивал выживаемость мышаей линии DBA-2 [204]. Известно, что и многие другие фенольные соединения обладают мощным антиоксидантным действием и могут иметь противораковую активность. По данным [205] антиоксидант из группы экранированных фенолов – фенозан, при введении *in vivo* обладает способностью снижать частоту, множественность и количество опухолей у мышей SHR. По-видимому, изучение влияния антиоксидантов, в частности имеющих фенольную природу, на развитие и течение опухолевого процесса требует дальнейших исследований.

Таким образом, в последние десятилетия механизм действия сравнительно простых соединений, таких как каротиноиды, флавоноиды, витамины и микронутриенты, изучен довольно подробно. Всевозрастающее количество работ говорят о том, что эти соединения представляют собой эффективные антиоксиданты. Тысячи проведенных исследований *in vitro* свидетельствуют о широких возможностях использования натуральных фенольных АО в профилактике и лечении сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных и др. заболеваний [206]. Однако результаты эпидемиологических исследований по влиянию фитонутриентов пищи на здоровье людей не столь оптимистичны: по ряду причин эффективность действия принимаемых с едой или напитками АО оказалась ниже, чем можно

было бы ожидать. Во-первых, часть потребляемых АО попросту выводится из организма, вследствие чего биодоступность, к примеру, флавоноидов составляет лишь 10-50% [207]. Во-вторых, в организме, подвергаясь действию пищеварительных соков, АО превращаются в метаболиты, активность и механизм действия которых могут отличаться от исходного вещества. Наконец, в-третьих, с учетом процессов биотрансформации, которым подвергается исходное соединение в организме, концентрация АО в месте его расходования (крови или ткани), как правило, оказывается ниже той, которая является эффективной *in vitro*. Дополнительной проблемой является способность АО при определенных условиях проявлять прооксидантное действие, что не позволяет их использовать в качестве универсальных средств борьбы с раком и старением. Так, широкомасштабные клинические исследования влияния β -каротина на развитие рака легких у курильщиков и рабочих, занятых на асбестном производстве, не только не выявили его защитного действия, но и, напротив показали увеличение риска развития данного заболевания у лиц, получавших β -каротин, по сравнению с контролем [208]. В связи с этим представляется крайне важным более детальное исследование *in vivo* процессов биотрансформации, адсорбции в тканях и фармакокинетики АО растительного происхождения.

Среди фитоагентов в особую группу следует поместить ЭМ. Синтезируясь в растениях в ничтожно малых количествах, они способны, тем не менее, влиять на ключевые процессы роста и жизнедеятельности растений. В этом смысле ЭМ в растениях выполняют роль, подобную той, которая у животных отведена гормонам и нейромедиаторам. Другой особенностью ЭМ является чрезвычайная сложность их состава, который порой включает до 200 соединений разной химической природы. На стабильность химического профиля того или иного ЭМ оказывают влияние не только географические и климатические условия в регионе произрастания растения. Состав ЭМ или экстрактов одного и того же растения может существенно различаться в разные сезоны одного года. К сожалению, не всегда авторы исследований указывают полный химический состав изучаемого ЭМ или экстракта, что значительно затрудняет сопоставление результатов публикуемых работ. По понятным причинам в особенной мере это касается результатов эпидемиологических и аналитических исследований.

Еще одной насущной проблемой, как нам представляется, является поиск компонентов ЭМ, обуславливающих фармакологические эффекты. В случае карвакролсодержащих масел эта роль преимущественно отводится основным по содержанию фенольным соединениям – карвакролу и тимолу, а также монотерпеновым углеводородам. При этом практически не обсуждается возможный самостоятельный вклад минорных соединений или их способность

взаимодействовать и давать синергетический эффект с основными компонентами. Дискуссионным также остается вопрос и о том, насколько результаты экспериментов *in vitro* или на клеточных культурах при исследовании таких сложных субстанций, как ЭМ, соответствуют реальным процессам, происходящим в клетках живого организма.

В связи с ростом популярности эфирных масел и других соединений растительного происхождения в промышленности, медицине и пищевой индустрии в качестве компонентов т.н. функционального питания, вышеозначенные проблемы приобретают все большую остроту и актуальность. Совершенно ясно, что натуральные АО и биологически активные вещества, такие как ЭМ, являются перспективными средствами коррекции множества патологических состояний. Однако, не менее очевидно и то, что в настоящее время имеется дефицит научных исследований, направленных на изучение путей влияния ЭМ на метаболизм, на развитие и течение болезней в живом организме.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Характеристика эфирных масел чабера и орегано

Для проведения работы были выбраны эфирные масла орегано (*Origanum vulgare* L.) и чабера садового (*Satureja hortensis* L.) производства компании Lionel Hitchen Ltd., Великобритания. Они имеют близкий качественный состав компонентов, обладают широким спектром биологического действия и являются эффективными антиоксидантами. Если орегано растет преимущественно в южных странах (Турция, Греция, Италия, Франция, Испания, Египет), то чабер можно успешно выращивать в средней полосе России и получать из него эфирное масло или использовать высушенное растение в качестве пряно-ароматической добавки в пищу. Состав компонентов эфирных масел определен методом капиллярной газо-жидкостной хроматографии (ГХ) и хромато-масс спектрометрии (ГХ-МС), величины индексов удерживания (ИУ) этих соединений и их содержание в эфирных маслах чабера и орегано приведены в Таблице 2.1, методики ГХ и ГХ-МС анализов приведены в разделе 2.3.2.

Таблица 2.1.

Состав эфирных масел орегано и чабера (%)

ИУ	Соединение	Орегано	Чабер
925	α -Туйен	0,39	1,00
933	α -Пинен	2,06	0,70
946	Камфен	0,58	0,53
961	Сабинен	0,50	0,62
974	β -Пинен	1,55	0,23
983	β - Мирцен	-	1,70
1000	α -Фелландрен	-	0,20
1012	α -Терпинен	0,92	1,91
1015	p -Цимен	13,00	10,73
1023	1,8-Цинеол	0,22	0,86
1026	Лимонен	-	1,02
1038	Оцимен	-	0,20
1052	γ -Терпинен	8,73	11,48
1056	Сабинен гидрат	-	0,47

Продолжение Таблицы 2.1.

1085	Линалоол	2,38	0,54
1152	Изоборнеол	0,32	1,86
1165	4-Терпинеол	-	0,88
1175	α -Терпинеол	-	0,18
1240	Борнилацетат	-	5,93
1271	Тимол	4,23	17,48
1283	Карвакрол	63,28	32,23
1420	β -Кариофиллен	1,64	4,19
1431	α -Бергамотен	-	0,52
1443	Аромадендрен	-	0,15
1491	Миристицин	-	0,74
1496	Бициклогермакрен	-	1,82
1503	Бисаболен	-	0,18
1518	δ -Кадинен	-	0,45

2.1.2. Характеристика экспериментальных животных

В работе использовали лабораторных мышей 3-х линий.

1. Мыши-самцы высокоракковой линии AKR. Эта линия характеризуется развитием спонтанного лейкоза в возрасте 7-10 месяцев в 85% случаев, при этом средняя продолжительность жизни животных составляет 9 месяцев [209].

2. Самки линии Balb/c

3. Мыши-гибриды F1 DBA^XC57Black (самки)

Содержание животных

Животных получали из питомника Столбовая в возрасте 2 месяцев, размещали в клетках из нержавеющей стали размером 220×320×500 мм и содержали на общевиварном рационе. Гранулированный корм включал пшеницу, кукурузу, ячмень, соевый шрот, подсолнечный жмых, рыбную муку, сухое молоко, кормовые дрожжи, известковую муку, витаминный комплекс, ростки солода, минеральную смесь (рецепт ПК120 ООО “Лабораторкорм”, Москва). Температура воздуха в помещении поддерживалась на уровне 20–22°C при естественном освещении.

Мыши контрольной группы получали стандартный лабораторный корм и чистую питьевую воду *ad libitum*. Животные экспериментальных групп содержались при свободном

доступе к корму и на протяжении всех экспериментов вместо чистой питьевой воды употребляли воду с добавлением определенного количества эфирного масла. Для этого готовили исходные растворы различных концентраций ЭМ в воде, представляющих собой ароматную слабо опалесцирующую жидкость, которые затем добавляли в питьевую воду. При этом дневную дозу ЭМ определяли, исходя из наблюдений, показывающих, что за сутки 1 мышь выпивает около 2-3 мл жидкости.

2.2. Дизайн экспериментов

Исследование действия ЭМ орегано на организм здоровых мышей Balb/c

Мыши линии Balb/c в возрасте 2 месяцев были взяты из питомника и случайным образом разделены на 3 группы по 100 животных в каждой. Контрольная группа в течение всего эксперимента получала обычную питьевую воду. Мыши двух опытных групп получали воду, содержащую ЭМ орегано в двух концентрациях: большая доза - 0,15 мкг/мл (БД) и малая доза – 0,015 нг/мл (МД). В возрасте 2, 5, 9, 16 и 25 месяцев производили забой по 5 мышей, извлекали кровь, мозг и печень животных для определения биохимических показателей. Длительность приема эфирного масла орегано мышами составляла, соответственно 0, 3, 7, 14 и 23 месяца. Оставшиеся мыши трех групп (в каждой по 75 шт) продолжали получать воду или воду с эфирным маслом до естественной гибели последнего животного.

Данные по продолжительности жизни использовали для построения кривых смертности мышей в контрольной и опытных группах. Математическую обработку проводили на участках кривых, где наблюдалась массовая гибель животных. Для этого использовали уравнение линейной регрессии вида:

$$y = Ax + B, \quad (2.1)$$

где А и В – коэффициенты линейной регрессии,

у – смертность,

х – возраст.

Используя данное уравнение, вычисляли скорость гибели животных в опыте и в контроле, среднюю и максимальную продолжительность их жизни. Результаты и их статистическая обработка с использованием программы SigmaPlot 10.0 приведены в разделе 3.1 настоящей работы.

Исследование противоопухолевой активности ЭМ орегано в опытах с мышами-гибридами F1 DBA×C57 Black с карциномой Льюис

Мыши-гибриды F1 DBA×C57Black были получены из питомника в возрасте 2 месяцев. 10 мышей этого возраста использовали для определения биохимических показателей в крови, печени и мозге молодых интактных животных. Оставшиеся 70 мышей были разделены случайным образом на 2 группы. Контрольная группа животных получала стандартный лабораторный корм и обычную питьевую воду. Опытная группа получала эфирное масло орегано с питьевой водой (концентрация масла в воде 0,15 мкг/мл) и стандартный корм. Через 3 месяца эксперимента по 5 мышей в возрасте 5-ти месяцев из контрольной и опытной групп забивали для проведения исследований физико-химических характеристик крови и органов. Оставшимся животным контрольной (30 шт) и опытной (30 шт) групп перевивали солидную опухоль путем внутримышечного введения суспензии опухолевых клеток в двух концентрациях: 5×10^4 или 5×10^5 клеток в инокуляте. Полученные таким образом 4 группы животных наблюдались в течение месяца, у них определяли степень прививаемости опухоли и ее размер.

Результаты использовали для построения кривых роста опухоли, математическую обработку которых проводили согласно уравнению линейной регрессии $2.1, y = Ax + B$,

где y – средний размер опухоли,

x – время роста опухоли,

A и B – коэффициенты линейной регрессии.

Параметр A – коэффициент регрессии, соответствующий скорости роста опухоли, так как регрессия описывается уравнением первого порядка. Для проверки значимости коэффициентов регрессии вычисляли t -статистику, которая показывает, во сколько раз коэффициент превышает свою среднюю ошибку в выборке. Соответствующая величина P (уровень значимости или вероятность ошибки) измеряет вероятность случайного появления в выборке значений t , равных или больших, чем данное значение. Если $P < 0,05$, значение коэффициента регрессии является статистически значимым. В данном эксперименте, как показано в разделе 3.2, для параметра A значение P всегда было $< 0,05$, т.е. скорость роста опухоли определяла ее средний размер в выборке. Вычисляемый параметр R^2 (коэффициент детерминации) показывает, насколько введенная аппроксимация отражает течение реального процесса: чем ближе значение R^2 к единице, тем выше достоверность аппроксимации.

Кривые роста опухоли и статистическая обработка с использованием программы SigmaPlot 10.0 полученных результатов приведены в разделе 3.2.

Изучение влияния эфирного масла чабера на организм высококорковых мышей АКР

Мыши линии АКР в возрасте 2 месяцев были разделены на 2 группы. Контрольная группа (120 мышей) на протяжении всего эксперимента получала обычную питьевую воду. Животные опытной группы (100 мышей) с возраста 3 месяцев получали питьевую воду, содержащую ЭМ чабера садового в концентрации 0,15 мкг/мл, при этом каждая мышь, выпивая около 2 мл такого раствора, получала около 0,3 мкг эфирного масла в сутки.

Для биохимических исследований по 10 мышей контрольной группы забивали в возрасте 4, 6, 8 и 10 месяцев, основной опытной группы – в возрасте 4 и 6 месяцев, то есть экспериментальные животные употребляли ЭМ в течение 1 и 3 месяцев, соответственно. Для исследований брали кровь, тимус, селезенку, мозг и печень животных. Остальные животные (100 мышей в контрольной и 90 мышей в опытной) доживали до естественной гибели. Эксперимент продолжался до гибели последнего животного. Полученные данные по продолжительности жизни мышей использовали для построения кривых смертности. Линейные участки кривых смертности, где наблюдали массовую гибель животных от лейкоза, были аппроксимированы уравнением 2.1, $y = Ax + B$, где

y – смертность,

x – возраст,

A и B – коэффициенты линейной регрессии.

Из уравнения линейной регрессии были рассчитаны скорость гибели животных, их средняя и максимальная продолжительность жизни, время латентного периода лейкоза. Результаты и статистический анализ с использованием программы SigmaPlot 10.0 приведены в разделе 3.3.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Спектрофотометрический метод использовали для определения величин ТБК-АП в гомогенатах тканей, для оценки антиоксидантной активности липидов тканей печени и мозга различными методами, для определения степени гемолиза эритроцитов. Все измерения проводили на приборе СФ -2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия) в кварцевых кюветах толщиной 1 и 0,5 см.

Определение степени гемолиза эритроцитов [210]

Степень гемолиза эритроцитов является характеристикой устойчивости мембран клеток к механическому разрушению. Одной из причин снижения прочности мембран может быть интенсификация процессов перекисного окисления липидов мембран. Степень гемолиза

эритроцитов контрольных и опытных проб определяли по следующей методике. Готовили 5%-ную взвесь отмытых эритроцитов в трис-НСl буфере (рН =7,4), разведенном в соотношении 1 : 1 физиологическим раствором, затем ее центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин и определяли оптическую плотность супернатанта при $\lambda = 532$ нм. Степень гемолиза эритроцитов в образцах рассчитывали по формуле 2.2:

$$\text{Степень гемолиза (\%)} = \frac{A(532)}{2} \times 100, \text{ где} \quad (2.2)$$

$A(532)$ – оптическая плотность при $\lambda = 532$ нм.

Математическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 10.0. Стандартное отклонение средних величин из 3-х измерений не превышало 6% (относительных).

Определение содержания ТБК-АП в мембранах эритроцитов [210]

Определение содержания вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов – ТБК-активных соединений (ТБК-АП) является общепринятой методикой оценки интенсивности процессов ПОЛ. Продукты расщепления пероксидов жирных кислот в липидах, в основном малоновый диальдегид, дают окрашенные азометиновые комплексы с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), содержание которых количественно определяется спектрофотометрическим методом. Содержание ТБК-АП в эритроцитах определяли в тех же пробах, что и гемолиз.

После измерения степени гемолиза эритроцитов супернатант контрольных и опытных образцов возвращали в пробирки с оставшимся после центрифугирования осадком. Затем туда же добавляли 1 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 0,3 мл 5Н НСl и 1,2 мл 0,7%-ного раствора ТБК. Пробирки помещали на 30 минут в кипящую водяную баню. После кипячения их охлаждали в холодной воде 3-5 мин, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием в течение 30 минут при 330 g. Сразу после центрифугирования отбирали по 2 мл супернатанта в чистую кварцевую кювету (1 см) и на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр») измеряли оптическую плотность опытной пробы против холостой пробы при двух длинах волн: 532 и 570 нм.

Содержание ТБК-АП рассчитывали по формуле 2.3:

$$C_{\text{ТБК-АП}} = \frac{\Delta A(532-570) \times V \text{ опыт. пр.}}{\varepsilon_{532} \times V \text{ эр} \times L}, \text{ где} \quad (2.3)$$

$C_{\text{ТБК-АП}}$ – концентрация малонового диальдегида, мкмоль / л эрит.массы;

$\Delta A_{(532-570)}$ – разница оптической плотности при $\lambda = 532$ и $\lambda = 570$ нм.

$V_{\text{опыт.пр.}}$ – объем смеси в пробирке, равный 4,2 мл;

$V_{\text{эр}}$ – объем эритроцитарной массы, равный 0,038 мл;

ε_{532} – молярный коэффициент экстинкции триметинового комплекса, равный
0,156 мкм⁻¹·см⁻¹

L – толщина кюветы, равна 1 см.

Математическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 10.0. Стандартное отклонение средних величин из 3-х измерений не превышало 5% (относительных).

Определение содержания ТБК-АП в гомогенатах тканей печени и мозга [211]

Навески тканей печени (1 г) и мозга (0,5 г) животных контрольной и опытных групп гомогенизировали вручную с 2 мл 10%-ного раствора ТХУ и 0,25 мкл 0,01%-ного раствора дибунла в стеклянном гомогенизаторе со стеклянным пестиком. Гомогенаты разделяли на 2 параллельные пробы, каждую центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (8000 об/мин), в чистые пробирки отбирали полученные супернатанты, добавляли к ним по 1,36 мл 0,7%-ного раствора ТБК и фиксировали вес полученных проб. Пробы выдерживали в кипящей водяной бане в течение 15 мин. После кипячения их охлаждали в холодной воде (3-5 мин), переносили в кварцевые кюветы с толщиной 1 см и измеряли оптическую плотность опытных проб против холостой пробы при двух длинах волн: 532 и 570 нм на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр»).

Количественное содержание ТБК-АП в тканях рассчитывали по формуле 2.4:

$$C_{\text{ТБК-АП}} = \frac{\Delta A_{(532-570)} \times V_{\text{опыт. пр.}}}{\varepsilon_{532} \times m_{\text{навески}} \times L}, \text{ где} \quad (2.4)$$

$C_{\text{ТБК-АП}}$ – концентрация малонового диальдегида, нмоль / г ткани;

$\Delta A_{(532-570)}$ – разница оптической плотности при $\lambda = 532$ и $\lambda = 570$ нм.

$V_{\text{опыт.пр.}}$ – объем смеси в кювете, мл;

$M_{\text{навески}}$ – масса навески ткани, г;

ε_{532} – молярный коэффициент экстинкции триметинового комплекса, равный
0,156 мкм⁻¹·см⁻¹

L – толщина кюветы, равна 1 см.

Математическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 10.0. Стандартное отклонение средних величин из 3-х измерений не превышало 5% (относительных).

Определение активности антиоксидантных ферментов в печени мышей

Для определения активности АО ферментов печень перфузировали для удаления следов крови холодным 0,174 М раствором KCl, промывали и отжимали на фильтровальной бумаге. Навески печени (500 мг) гомогенизировали в 4,5 мл среды выделения, гомогенат центрифугировали при 750 g в течение 10 мин на центрифуге K24, осадок удаляли. Полученный супернатант снова центрифугировали 10 мин при 8000 g, осадок содержал митохондрии. Надосадочную жидкость центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин на центрифуге Beckman. Полученный супернатант, представляющий собой цитозольную фракцию, использовали для определения активности ферментов в цитозоле. Осажденные в ходе второго центрифугирования митохондрии промывали в среде гомогенизации и использовали для последующего определения ферментативной активности. Все операции проводили при 0–4°C.

Методика определения активности супероксиддисмутазы (СОД)

Активность Cu,Zn – СОД определяли по ингибированию реакции восстановления нитросинего тетразолия супероксидными радикалами, генерируемыми ксантиоксидазой при окисления ксантина [212].

Реакционная смесь с ксантином и тетразолием. К 1 мл 5 μМ раствора ксантина добавляли 2 мл 0,625 mM раствора нитросинего тетразолия (НСТ) и 4 мл 0,5 М раствора Na₂CO₃, после чего добавляли 0,05М фосфатный буфер (pH= 7,4), так что конечный объем смеси составлял 40 мл.

Далее осуществляли подбор концентрации ксантиоксидазы (КО): суспензию КО разбавляли приблизительно в 30 раз в 0,05М фосфатном буфере с pH=7,4. К 2 мл реакционной смеси добавляли аликвоты ксантина (20-30 мкл). Путем подбора добивались, чтобы начальная скорость восстановления НСТ без СОД за 1 мин была близка к значению 0,02. Скорость реакции выражали в единицах оптической плотности раствора в единицу времени.

Опытный образец разводили в 30 раз 0,05 М фосфатным буфером (pH=7,4). Затем к реакционной смеси добавляли 20-250 мкл образца и выбранное количество КО, так, чтобы общий объем составлял 2 мл, быстро перемешивали и в термостатируемой кювете

спектрофотометрически регистрировали изменения оптической плотности при 560 нм в течение 40-60 сек. Для каждого образца реакцию проводили не менее 3-4 раз с различными аликвотами.

Степень ингибирования, %, рассчитывали по формуле 2.5:

$$I = (V_{KO} - V_{обр} / V_{KO}) \times 100, \text{ где} \quad (2.5)$$

I – процент ингибирования, %;

V_{KO} – изменение оптической плотности раствора восстанавливающего НСТ без СОД за одну минуту;

$V_{обр}$ – изменение оптической плотности раствора восстанавливающего НСТ в присутствии СОД изучаемого образца за одну минуту.

За единицу активности принимали количество фермента, приводящее к 50% ингибированию скорости образования формазана. Активность относили к 1 мг ткани печени. Для этого строили график зависимости I (%) от количества добавленного образца в мкл и определяли количество образца, ингибирующего скорость восстановления формазана на 50% (I_{50}).

Активность СОД в образцах определяли по формуле 2.6:

$$A = 2,0 \times \text{разведение} / I_{50} / m_{\text{навески}}, \text{ где} \quad (2.6)$$

I_{50} – объем образца, ингибирующего скорость восстановления формазана на 50%, мкл;

$m_{\text{навески}}$ – масса навески ткани печени, мг

Методика определения активности глутатионпероксидазы (ГП)

Активность глутатионпероксидазы изучали по окислению восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) в сопряженной глутатионредуктазной реакции с использованием в качестве субстрата гидропероксида трет-бутила (ГПТБ) [213, 214]. Предварительно измеряли активность глутатионредуктазы (ГР). Для этого к 1900 мкл 0,05 М фосфатного буфера (рН = 7,5) добавляли 15 мкл 40 mM раствора NADPH. Затем измеряли оптическую плотность раствора при $\lambda = 340$ нм и по формуле 2.7 рассчитывали реальную концентрацию NADPH, которая в дальнейшем потребуется для расчета концентрации предварительного раствора.

$$C_{NADPH} = A_{340} \times 1915 / (15 \times \epsilon_{340}), \text{ где} \quad (2.7)$$

C_{NADPH} – реальная концентрация NADPH в полученном растворе, mM

A_{340} – значение оптической плотности при $\lambda = 340$ нм

ϵ_{340} – коэффициент молярной экстинкции при $\lambda = 340$ нм ($6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Далее добавляли в кювету 5 мкл суспензии ГР и начинали реакцию добавлением в кювету 100 мкл 20mM раствора дисульфида глутатиона (GSSG), фиксируя скорость изменения оптической плотности раствора за 1 мин (V_x) при $\lambda = 340$ нм. Активность ГР рассчитывали по формуле 2.8:

$$A_{ГР} = V_x \times 2020 / (5 \times \epsilon_{340}), \text{ где} \quad (2.8)$$

$A_{ГР}$ – активность ГР в полученном растворе, U/л или U/мл

V_x – скорость изменения оптической плотности раствора за 1 мин, ед.о.п./ мин

ϵ_{340} – коэффициент молярной экстинкции при $\lambda = 340$ нм ($0,0062 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

Затем готовили предварительные растворы реактивов, учитывая следующие требования:

- добавляемые в кювету для измерения активности ГР аликвоты должны быть равны 100 мкл,

- концентрации реагентов, учитывая 20-кратное разведение при добавлении 100 мкл этих растворов в кювету ($V = 2000$ мкл), непосредственно в реакционной смеси должны быть равны :
NADPH = 0,2 mM; GSH = 1,0 mM; ГР = 0,5 U/мл и ГПТБ = 0,023%.

а) Раствор № 1 (V рассчитывали в зависимости от количества исследуемых образцов).

Представлял собой 4 mM раствор NADPH, который, используя предварительно полученную реальную концентрацию исходного раствора NADPH, готовили разбавлением его 0,05 M фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,5$) до необходимой концентрации.

б) Раствор № 2 (V рассчитывали в зависимости от количества исследуемых образцов).

Представлял собой смесь растворов ГР и глутатиона (GSH), разбавленные 0,05 M фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,5$) так, чтобы концентрация ГР составляла 10 U/мл и GSH – 20 mM, соответственно.

в) Раствор № 3 (V рассчитывали в зависимости от количества исследуемых образцов).

Представлял собой 0,47% раствор ГПТБ, который готовили последовательным разбавлением 70% раствора ГПТБ 0,05 М фосфатным буфером (pH = 7,5) сначала в 10 раз, а затем еще в 15 раз.

Перед измерением активности ГП проводили холостую реакцию: к 1700 мкл 0,05 М фосфатного буфера (pH = 7,5) добавляли по 100 мкл всех трех предварительных растворов. Раствор NADPH добавляли последним и спектрофотометрически регистрировали изменения оптической плотности за 1 мин (V_{NADPH}).

Затем, в зависимости от аликвоты добавляемого образца (от 50-250 мкл), брали от 1450 до 1650 мкл буфера и по 100 мкл всех трех предварительных растворов, чтобы объем реакционной смеси был неизменным и равным 2000 мкл. Раствор ГПТБ добавляли последним и тут же при $\lambda = 340$ нм регистрировали изменение оптической плотности в течение 1 минуты ($V_{обр}$).

$V_{ГП}$ рассчитывали по формуле 2.9:

$$V_{ГП} = V_{обр} - V_{NADPH} \quad (2.9)$$

Активность ГП рассчитывали по формуле 2.10 и выражали в единицах ферментной активности ($U=1$ мкмоль/мин) на 1 мг навески ткани печени мышей.

$$A_{ГП} = (V_{ГП} \times \text{разведение}) / (\varepsilon_{340} \times m_{\text{навески}}), \text{ где} \quad (2.10)$$

$A_{ГП}$ - активность ГП, U/ мг ткани печени

$V_{ГП}$ – изменение при $\lambda = 340$ нм оптической плотности раствора окисляющегося NADPH в сопряженной глутатионредуктазной реакции с использованием в качестве субстрата ГПТБ в присутствии ГП изучаемого образца за одну минуту.

ε_{340} - коэффициент молярной экстинкции при $\lambda = 340$ нм ($0,0062 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$)

$m_{\text{навески}}$ – масса навески ткани печени, мг.

Методика определения активности глутатион-S-трансферазы (ГТ) [215]

Общую активность глутатион-S-трансферазы определяли в гомогенате печени по скорости образования глутатион S-конъюгатов между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ). Увеличение концентрации конъюгатов в ходе реакции регистрировали спектрофотометрически при длине волны 340 нм (максимум поглощения глутатион -S-ХДНБ) [215].

Для этого в термостатируемую кварцевую кювету $L = 1$ см, содержащую 2,5 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера $pH=6,5$, добавляли 0,2 мл 0,015 М раствора восстановленного глутатиона и 100 мкл исследуемого образца. Реакцию инициировали внесением в кювету 0,2 мл 0,015М ХДНБ. Параллельно с опытной готовили контрольную пробу, в которую вместо аликвоты образца вносили дистиллированную воду. Оптическую плотность регистрировали при $t=25^{\circ}C$ и длине волны 340 нм в течение 3 минут. За это время в присутствии ГТ изучаемого образца происходило связывание глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом с образованием S-(2,4-динитрофенил)-глутатиона, имеющего максимум поглощения при $\lambda = 340$ нм. Активность ГТ (A_{GT}) рассчитывали по формуле 2.11 и выражали в единицах ферментной активности ($U=1$ мкмоль/мин) на 1 мг навески ткани печени мышей.

$$A_{GT} = V_{GT} \times \text{разведение} / (\varepsilon_{340} \times m_{\text{навески}}), \text{ где} \quad (2.11)$$

V_{GT} – изменение оптической плотности раствора в течение 3 минут; ед.о.п./ мин,

ε_{340} – коэффициент молярной экстинкции при $\lambda = 340$ нм ($0,0096 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$),

$m_{\text{навески}}$ – масса навески ткани печени, мг.

2.3.2. Метод газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс спектрометрии

Метод капиллярной газо-жидкостной хроматографии (ГХ) использовали для определения состава эфирных масел орегано и чабера и для изучения состава жирных кислот в виде их метиловых эфиров (МЭЖК) в печени, мозге и эритроцитах мышей. Для идентификации компонентов эфирных масел и МЭЖК дополнительно использовали метод хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС).

ГХ анализ эфирных масел осуществляли на хроматографе Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м × 0,32 мм, слой фазы 0,25 мкм). Анализ проводили при программировании температуры колонки от 60 до 250 °С со скоростью 8 °С/мин при температуре инжектора и детектора 250 °С. Скорость газа-носителя гелия через колонку составляла 1,5 мл/мин. Пики на хроматограммах характеризовали величинами индексов удерживания. Содержание компонентов в смесях эфирных масел определяли отношением площади пика компонента к сумме площадей всех компонентов (%).

ГХ анализ МЭЖК в виде их гексановых растворов проводили на том же хроматографе «Кристалл 2000 М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (50 м×0,32 мм, слой фазы 0,25 мкм, фирма Supelco, США) при программировании температуры колонки от 120 до 270°С со скоростью 4°С /мин при температуре инжектора и детектора 270°С. Скорость газа-носителя гелия через колонку

составляла 1,5 мл/мин. Количественное содержание МЭЖК в образцах рассчитывали по отношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующим МЭЖК. Идентификацию МЭЖК проводили по величинам их индексов удерживания и масс-спектрам, которые получали проведением ГХ-МС анализа тех же растворов МЭЖК. Величины индексов удерживания рассчитывали из времени удерживания компонентов эфирных масел или смесей МЭЖК и времен удерживания соответствующих n-алканов по формуле 2.12:

$$IU = 100 (t_i - t_n) / (t_{n+1} - t_n) + 100 n, \text{ где} \quad (2.12)$$

t_i , t_n и t_{n+1} – времена удерживания анализируемого компонента и алканов с числом атомов углерода n и $(n + 1)$, между которыми элюируется этот компонент.

В качестве примера на Рисунке 2.1 и 2.2 представлены типичные хроматограммы МЭЖК, выделенных из мозга и печени мышей линии Valb/c (контрольная группа) в возрасте 2 месяцев.

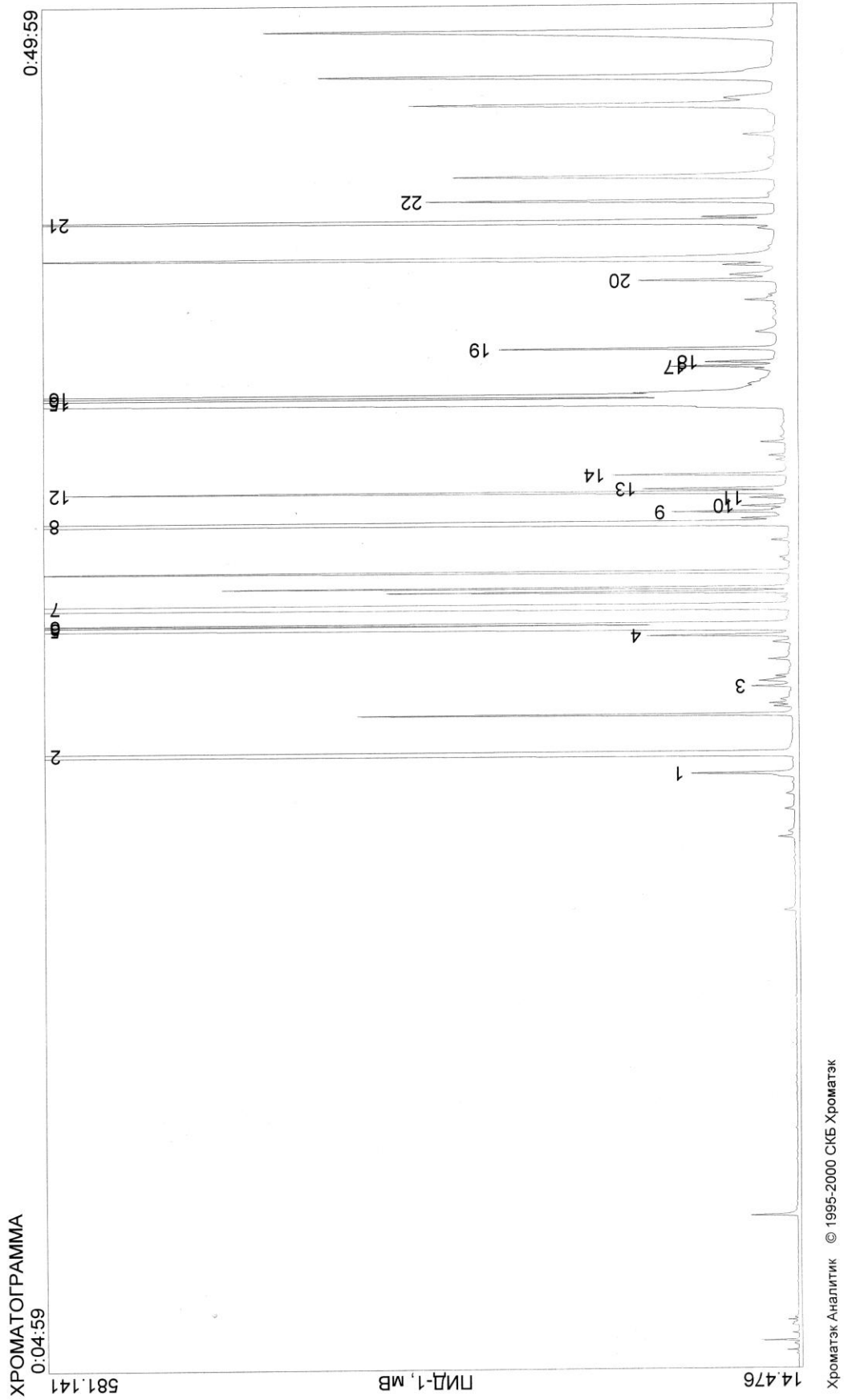


Рисунок 2.1. Хроматограмма МЭЖК мозга 2-месячных мышей Balb/c

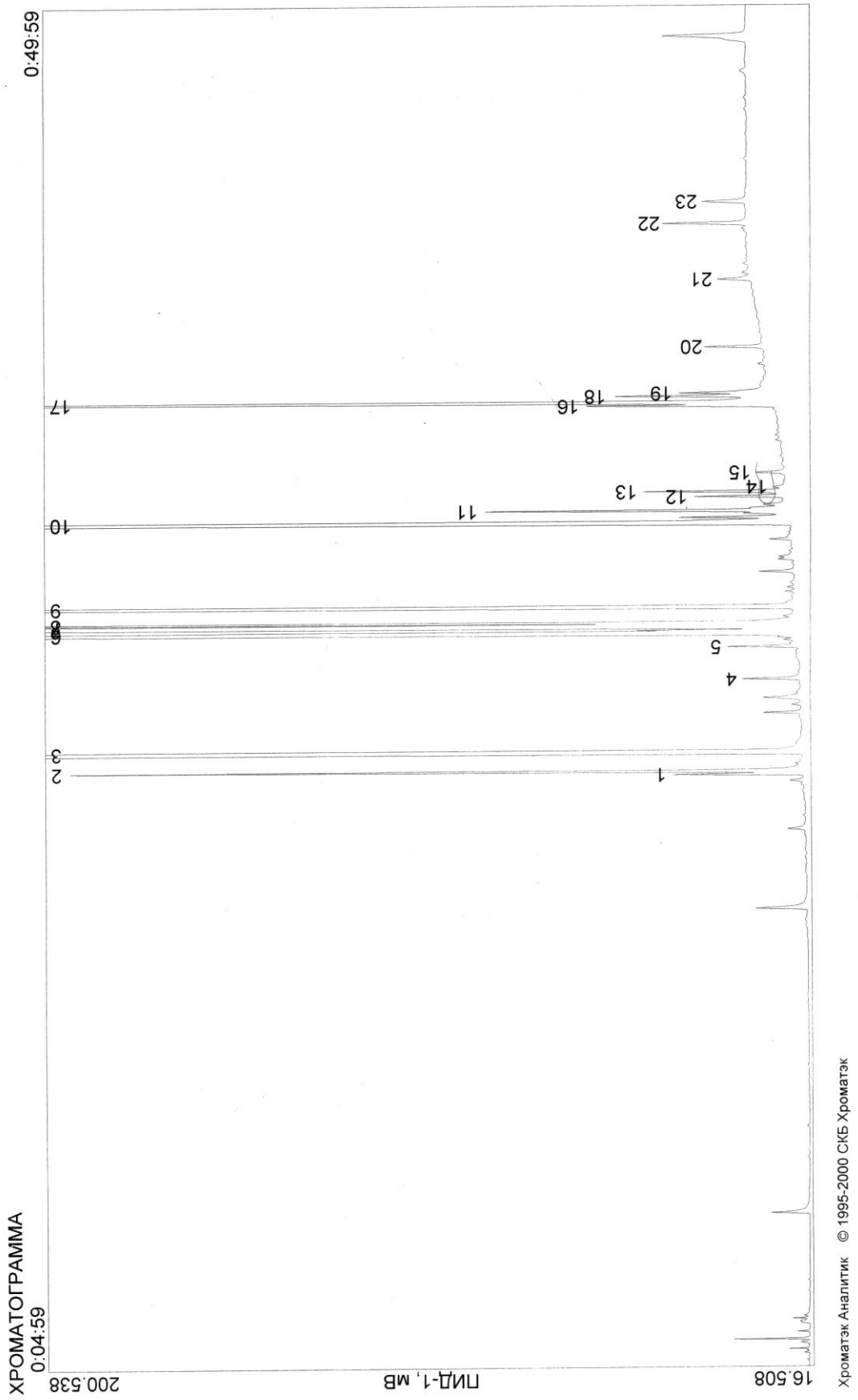


Рисунок 2.2. Хроматограмма МЭЖК печени 2-месячных мышей Balb/c

Хромато-масс спектрометрический анализ (ГХ-МС) компонентов эфирных масел проводили на приборе HP 5890/5980 (“Hewlett Packard”, США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-1 (25м x 0,30 мм, слой фазы 0,25 мкм) при программировании температуры от 50 до 250⁰С со скоростью 4⁰/мин. ГХ-МС анализ МЭЖК проводили на этом же приборе, но при другом температурном режиме анализа: начальная температура колонки составляла 120⁰С, программирование температуры от 120 до 270⁰С проводили со скоростью 8⁰/мин Температура инжектора и масс-детектора составляла 270⁰С. Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ. Идентификацию компонентов эфирных масел и МЭЖК осуществляли путём сравнения величин индексов удерживания и масс-спектров, полученных при анализах образцов, с индексами и спектрами стандартов, определёнными нами на этой же колонке, а также взятыми из библиотек масс-спектров NBS и Wiley 275.

Получение МЭЖК из эритроцитов

Экстракцию липидов из эритроцитов проводили по следующей методике. К 1 мл отмытых эритроцитов добавляли 3,75 мл смеси хлороформ-метанол в соотношении 1:2 и оставляли для экстракции на 1-2 часа, периодически встряхивая. Далее смесь центрифугировали (5 мин при 3000 об/мин), полученный супернатант переносили в другую пробирку. Оставшийся осадок вновь экстрагировали 4,75 мл смеси хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8 по объему), центрифугировали в том же режиме. Супернатанты от двух экстракций объединяли, добавляли 2,5 мл воды и 2,5 мл хлороформа. Смесь охлаждали в холодильнике, а затем центрифугировали. Хлороформный и водно-метанольный слои разделяли. Хлороформную фазу, содержащую липиды, помещали в круглодонную колбу и удаляли хлороформ на ротонном испарителе. Метилирование жирных кислот проводили по методике, описанной в [216]. Липиды растворяли в 5 мл метанола, добавляли 10 мкл 0,5% метанольного раствора н-тетрадекановой кислоты в качестве внутреннего стандарта, затем смесь охлаждали в морозильной камере холодильника в течение 1 часа; добавляли 200 мкл замороженного ацетилхлорида и кипятили на водяной бане 1 час. Затем добавляли 5 мл K₂CO₃ и 2 мл гексана, экстрагировали МЭЖК встряхиванием и центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин. Гексановую фазу, содержащую метиловые эфиры жирных кислот липидов, переносили в пробирку и проводили ГХ и ГХ-МС анализ.

Получение МЭЖК из печени и мозга

Органы (печень, мозг) перфузировали средой выделения, измельчали ножницами и гомогенизировали вручную в стеклянном гомогенизаторе со стеклянным пестиком. К 200 мг гомогената печени или мозга добавляли 5 мл метанола, 10 мкл 0,5% метанольного раствора н-тетрадекановой кислоты в качестве внутреннего стандарта, смесь охлаждали в морозильной камере холодильника в течение 1 часа; добавляли 200 мкл замороженного ацетилхлорида при охлаждении и интенсивном перемешивании и кипятили на водяной бане 1 час. К образцу добавляли 5 мл 6% водного раствора K_2CO_3 , встряхивали, добавляли 2 мл гексана, экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) встряхиванием в течение 5 минут и центрифугированием при 3000 об/мин 5 мин. Отделяли гексановую фазу, содержащую МЭЖК. В Таблице 2.2 приведены индексы удерживания и названия ЖК, которые были найдены в изученных образцах. При обозначении ЖК первая цифра соответствует количеству углеродных атомов, вторая – количеству ненасыщенных связей, третья – положению двойных связей в молекуле ЖК. Далее в таблицах мы использовали преимущественно короткие обозначения жирных кислот.

Таблица 2.2.

Величины индексов удерживания (ИУ) и названия жирных кислот, которые были найдены в изученных образцах

ИУ	Обозначение	Номенклатурное и тривиальное название	№ пика на рисунке	
			Мозг	Печень
1888	16:1 ω 7	9-гексадеценовая, пальмитолеиновая	1	2
1913	16:0	Гексадекановая, пальмитиновая	2	3
2013	17:0	Гептадекановая, маргариновая	3	4
2053	18:3 ω 6	6,9,12-октадекатриеновая	–	5
2074	18:2 ω 6	9,12-октадекадиеновая, линолевая	4	6
2081	18:1 ω 9	9-октадеценовая, олеиновая	5	7
2089	18:1 ω 7	11-октадеценовая	6	8
2113	18:0	Октадекановая, стеариновая	7	9
2231	20:4 ω 6	5,8,11,14-эйкозотетраеновая, арахидоновая	8	10
2249	20:3 ω 6	8,11,14-эйкозатриеновая	9	11
2273	20:2 ω 9	8,11-цис-эйкозадиеновая	10	–

Продолжение Таблицы 2.2.

2279	20:2 ω 6	11,14-эйкозодиеновая	11	12
2279	20:1 ω 9 20:3 ω 3	11-эйкозеновая 11,14,17-эйкозотриеновая	12	13
2281	20:1 ω 15	5-эйкозеновая	13	14
2314	20:0	Эйкозановая, арахидовая	14	15
2398	22:5 ω 6	4,7,10,13,16-докозапентаеновая	–	16
2409	22:6 ω 3	4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая	15	17
2427	22:4 ω 6	7,10,13,16-докозатетраеновая	16	18
2426	22:5 ω 3	7,10,13,16,19-докозапентаеновая	–	19
2479	22:1 ω 9	13-докозеновая	17	–
2480	22:1 ω 7	16-докозеновая, эруковая	18	–
2515	22:0	Докозановая, бегеновая	19	20
2615	23:0	Трикозановая	20	21
2680	24:1 ω 9	15-тетракозеновая	21	22
2715	24:0	Тетракозановая	22	23

2.3.3. Исследование биологической активности эфирного масла орегано на культуре клеток китайского хомячка

В работе использовали трансформированные клетки китайского хомячка линии B11-dii FAF28 (клон 237), полученные из Медико-генетического научного центра РАМН (Москва). Клетки культивировали в стеклянных флаконах Карреля, используя среду ДМСИ (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва) с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота ("Биолот", Санкт-Петербург), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересеивали в соотношении 1:10 – 1:3 через 3–4 сут. Для снятия клеток с флаконов использовали смесь (1:1) 0,02%-ного версена и 0,25%-ного трипсина (Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН, Москва).

Эфирное масло орегано перед проведением цитологических экспериментов растворяли в 96%-м этаноле, который предварительно стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 μ М (Acrodisc® Syringe Filter with Supor® Membrane, Pall Corp., США). Стерильность неразведенного ЭМ орегано, обладающего, как известно, выраженным бактерицидным действием [9], подтвердили с помощью посева на мясо-пептонный агар.

В предварительных исследованиях, направленных на определение цитотоксических или митогенных свойств ЭМ орегано, клетки 3-4-дневного "возраста" (т.е. выращиваемые без

пересева в течение 3-4 сут) заседали в герметично закрывающиеся пенициллиновые флаконы площадью 4,9 см² с плотностью около 100 тыс. кл./см² (суспензия в 2 мл ростовой среды, состоящей из 90% ДМСИ и 10% сыворотки крупного рогатого скота). В часть флаконов добавляли спиртовой раствор ЭМ орегано до конечной концентрации в среде (в пересчете на карвакрол) от 1×10^{-15} до 5×10^{-4} М. При этом исходные растворы ЭМ орегано были такой концентрации, чтобы обеспечить 1%-ное содержание этанола в ростовой среде (известно, что в такой концентрации спирт не влияет на размножение культивируемых клеток). В контрольные флаконы добавляли соответствующее количество чистого этанола (20 мкл на 2 мл среды). Флаконы помещали на 4 сут в термостат (37°C), после чего клетки снимали с поверхности роста смесью растворов версена и трипсина и подсчитывали их количество с помощью камер Горяева (2-3 флакона на точку, 4 камеры на флакон).

После выбора двух соответствующих концентраций (см. раздел 3.1.2) оценили влияние ЭМ орегано на кинетику роста клеток и их последующей гибели в стационарной фазе роста. Для этого клетки 3-дневного "возраста" сняли с поверхности флакона Карреля смесью растворов версена и трипсина, суспендировали в ростовой среде (90% ДМСИ и 10% сыворотки крупного рогатого скота), развели средой до необходимой концентрации клеток и посеяли по 2 мл суспензии в 108 герметично закрывающихся пенициллиновых флаконов площадью 4,9 см² (плотность посева - 100 тыс. кл./см²). Все флаконы поместили в термостат (37°C). Через сутки после посева с помощью смеси растворов версена и трипсина сняли клетки со дна 3 флаконов и подсчитали их количество в камере Горяева, дабы определить плотность прикрепившихся клеток. После этого в 35 флаконов ввели по 20 мкл спиртового раствора ЭМ орегано до концентрации 25 мкМ, в 35 флаконов – по 20 мкл спиртового раствора ЭМ орегано до концентрации 250 мкМ и в 35 флаконов - по 20 мкл чистого спирта (контроль). Затем флаконы вернули в термостат. После этого через определенные промежутки времени извлекали из термостата 9 флаконов (по три из каждой группы), клетки снимали с поверхности роста смесью версена и трипсина, суспендировали в ростовой среде без сыворотки и оценивали количество клеток в каждом флаконе с помощью 4 камер Горяева.

Математические расчеты и статистическую обработку результатов производили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и SigmaPlot 10.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение биологической активности эфирного масла орегано

3.1.1. Влияние эфирного масла орегано на продолжительность жизни здоровых мышей линии Balb/c

В настоящее время отсутствует системное исследование по оценке комплексного действия на организм эфирных масел: большая часть данных получена либо на клеточных культурах, либо *in vitro*. Кроме того, нет достоверных сведений о возрастных изменениях в биохимических показателях органов и тканей животных на протяжении всей жизни. Тем не менее, в свете растущего интереса к изучению этих биологически активных веществ, а также возможностей их дальнейшего практического применения для профилактики или лечения ряда заболеваний первостепенной становится необходимость научно-обоснованного понимания их действия на здоровый целостный организм.

Поэтому одной из задач проведенного нами исследования было определение влияния длительного приема эфирного масла орегано на организм мышей Balb/c, содержащихся в стандартных условиях и не подвергавшихся действию повреждающих факторов. Эфирное масло добавляли в питьевую воду на протяжении всей жизни опытных животных, начиная с 1-го месяца, в концентрации 0,15 мкг/мл (большая доза) и 0,015 нг/мл (малая доза). Контрольные мыши содержались на обычной питьевой воде. В возрасте 2, 5, 9, 16 и 25 месяцев у животных контрольной и опытных групп исследовали ряд физиологических и биохимических характеристик органов и тканей.

В течение всей жизни регистрировали кривую смертности животных всех групп. На линейном участке полученной кривой проводили аппроксимацию с использованием уравнения линейной регрессии 2.1, которое приведено в разделе 2.2. Уравнение 2.1 позволяет вычислить такие параметры как средняя и максимальная продолжительность жизни животных, скорость гибели, время латентного периода. Результаты построений представлены на Рисунке 3.1. Значения расчетных величин продолжительности жизни, времени латентного периода смертности, скорости гибели животных приведены в Таблице 3.1.

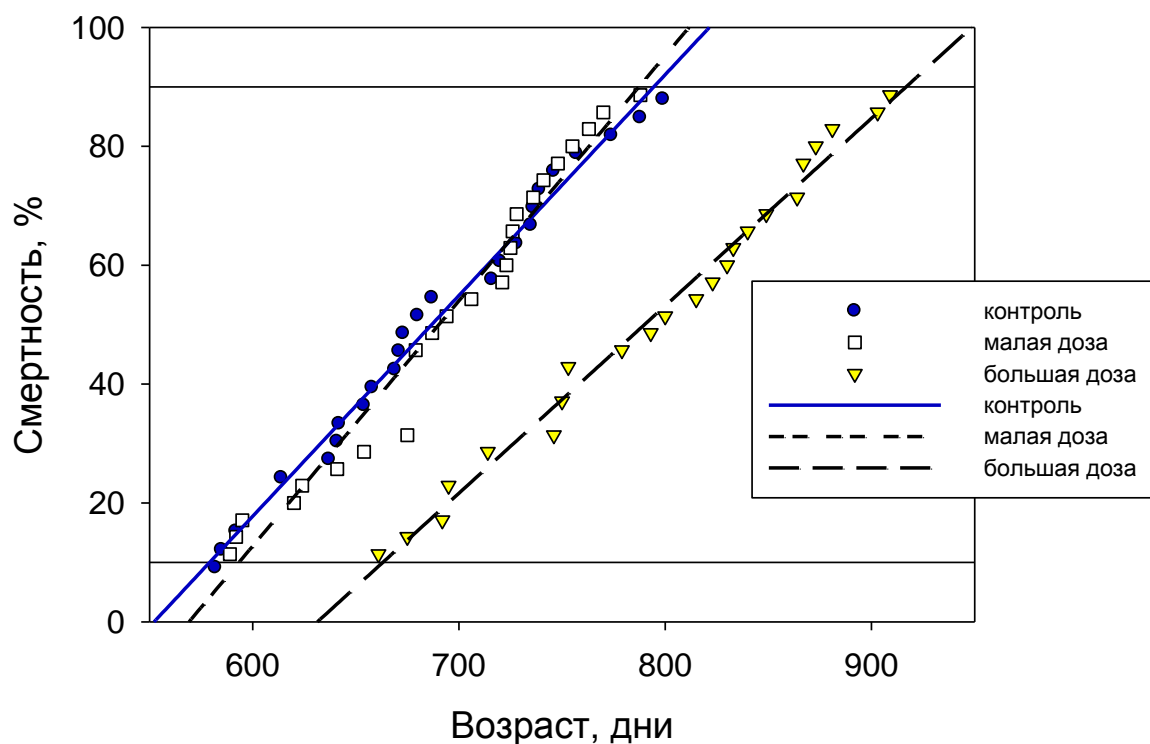


Рисунок 3.1. Кривые смертности мышей Valb/c в контроле и при употреблении эфирного масла орегано в разных дозах. Кривые аппроксимированы уравнениями линейной регрессии: $y_{\text{(контроль)}} = 0,37x - 204,2$, $y_{\text{(большая доза)}} = 0,32x - 208,2$

$$y_{\text{(малая доза)}} = 0,41x - 232,9$$

$$y_{\text{(малая доза)}} = 0,41x - 232,9$$

Таблица 3.1.

Математическая и статистическая обработка кривых смертности мышей Valb/c в контроле и при употреблении эфирного масла орегано в разных дозах

	Контроль	Малая доза	Большая доза
R^2 (коэффициент детерминации)	0,99	0,97	0,99
p (уровень значимости)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Скорость гибели (коэффициент регрессии A)	$0,37 \pm 0,01$	$0,41 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,02$
Средняя продолжительность жизни, дни	687	690	807
Максимальная продолжительность жизни, дни	822	812	963
Латентный период, дни	552	568	651

В результате исследования впервые было установлено, что мыши, которые регулярно принимали около 0,3 мкг/день ЭМ орегано, жили в среднем дольше, чем мыши контрольной группы. Как видно из Рисунка 3.1, кривая смертности мышей, принимавших эфирное масло в большой дозе (0,15 мкг/мл воды), значительно сдвинута вправо по сравнению с кривой в контроле. При приеме малой дозы эфирного масла орегано (0,015 мкг/мл воды) выживаемость мышей была такой же, как и в контроле.

Использованная нами модель регрессии хорошо аппроксимирует исходные данные, поскольку значение R^2 близко к 1, такой моделью можно воспользоваться для прогноза ряда величин, характеризующих выживаемость мышей. Из Таблицы 3.1 видно, что аппроксимация наиболее достоверна для данных контрольной группы и группы с большой дозой ЭМ орегано ($R^2=0,99$).

При $y=100$ из уравнения 2.1 находим расчетное значение величины максимальной продолжительности жизни животных. Как видно из Таблицы 3.1 максимальная продолжительность жизни животных в контроле и в опыте с малой дозой ЭМ орегано близки, тогда как в опыте с большой дозой этот показатель на 17% выше, чем в контроле.

Расчетное время начала гибели, называемое также временем латентного периода, находим из уравнения 2.1, принимая $y=0$. В опытной группе мышей, получавших орегано в малой дозе, время латентного периода практически не отличалось от контроля, а в случае с большой дозой оно увеличивалось на 12% (Таблица 3.1).

Из того же уравнения определяем среднюю продолжительность жизни животных (СПЖ), приняв $y=50$. СПЖ мышей при приеме масла в большей дозе была выше на 17% по сравнению с контролем, влияния приема орегано в малой дозе на этот показатель не выявлено.

О скорости гибели животных судили по наклону кривой, который характеризуется коэффициентом линейной регрессии A (Таблица 3.1). У мышей, получавших масло в малой дозе, скорость гибели животных на 10% выше, чем в контроле, напротив, употребление орегано в большей дозе снижает этот показатель на 14%. Следует отметить, что увеличение скорости гибели животных при приеме ЭМ орегано в малой дозе практически не повлияло на время латентного периода, на среднюю и максимальную продолжительность жизни животных в группе. Только при действии эфирного масла орегано в большей дозе был отмечен сдвиг кривой смертности и увеличение продолжительности жизни животных. Таким образом, можно сделать вывод о том, что активность эфирного масла орегано является дозозависимой.

Феномен увеличения продолжительности жизни экспериментальных животных может являться результатом не только направленного воздействия ЭМ на механизмы старения, но и следствием снижения риска развития или же более благоприятного течения заболеваний,

устойчивость к которым снижается с возрастом. Для многих соединений растительного происхождения (в том числе, эфирных масел) характерна способность повышать устойчивость организма к неблагоприятным факторам окружающей среды, модулировать и активировать иммунную систему, снижать вредное воздействие патогенных микроорганизмов и вирусов, химических токсикантов. Найденное увеличение продолжительности жизни [217–219] являлось следствием такого многогранного действия ЭМ. Важнейшим свойством таких соединений является наличие у них антиоксидантной активности и влияние на регуляторные системы организма через изменение его антиоксидантного статуса. В работе [220] было показано, что диета, обогащенная 2% смеси экстрактов орегано и клюквы, положительно влияла на выживаемость популяции плодовых мушек среднего возраста, а также повышала репродуктивные возможности молодых насекомых. Полученные нами данные о влиянии масла орегано на продолжительность жизни млекопитающих открывают новые перспективы в изучении способности природных продуктов, таких как эфирные масла, существенно влиять на качество и продолжительность жизни, а также служить профилактическими средствами, значительно снижающими риски развития заболеваний, связанных с окислительным стрессом и возрастом.

3.1.2. Исследование действия эфирного масла орегано *in vitro*

Эфирные масла, содержащие карвакрол, в том числе, эфирное масло орегано, известны в связи с их благотворным влиянием на здоровье и умственные способности человека [9, 221]. Для выяснения возможных цитологических механизмов, лежащих в основе такого действия, а также для определения цитотоксичности масла орегано, мы исследовали его действие в экспериментах на культивируемых трансформированных клетках почки китайского хомячка, используя несколько модельных систем, применяемых в цитогеронтологических исследованиях [222].

Возможные цитотоксические или митогенные эффекты препарата определяли анализом насыщающей плотности культуры на 4-е сутки культивирования при варьировании концентрации ЭМ в ростовой среде (в пересчете на карвакрол) от 1×10^{-15} до 5×10^{-4} М. Такой широкий диапазон концентраций был исследован в связи с ограниченностью имеющихся в литературе сведений о действии эфирных масел в малых концентрациях на клетки. По результатам тестирования для дальнейших экспериментов были выбраны две концентрации: $2,5 \times 10^{-5}$ М (25 мкМ) как максимально абсолютно нетоксичная и $2,5 \times 10^{-4}$ М (250 мкМ) как концентрация, в которой ЭМ орегано снижало плотность культуры клеток 4-дневного "возраста" приблизительно в 2 раза, т.е. цитотоксичная (Рисунок 3.2).

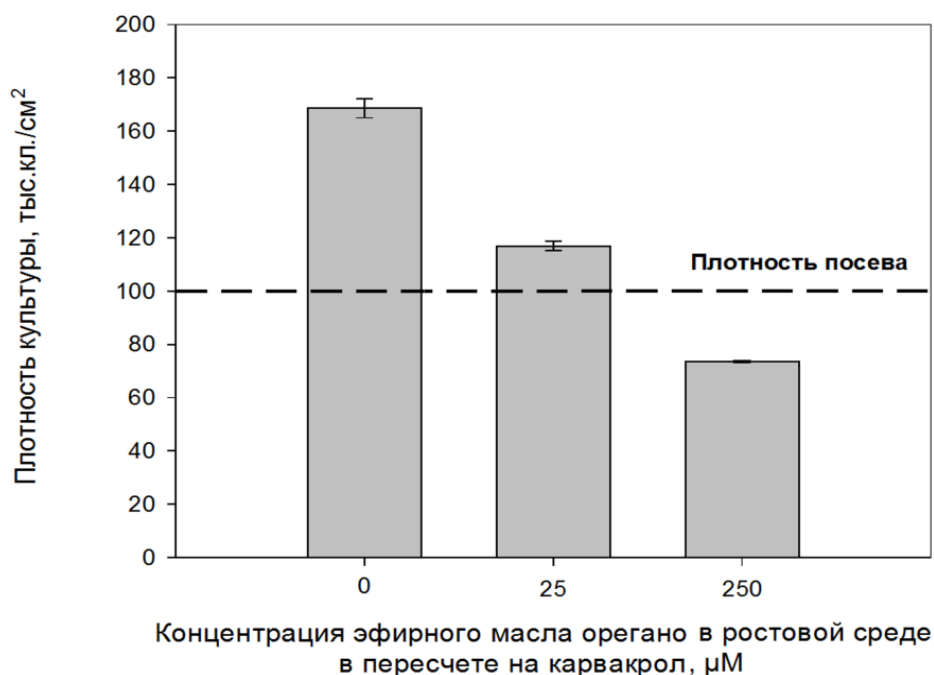


Рисунок 3.2. Влияние эфирного масла орегано на рост клеточной культуры на 4-е сутки культивирования

Выбор первой концентрации определило также то, что как было показано в работе словацких исследователей [223], именно эта концентрация карвакрола является минимально необходимой для выявления его защитного действия при воздействии на культивируемые клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) пероксидом водорода в концентрации $2,5 \times 10^{-4}$ М.

Те же концентрации препарата (25 мкМ и 250 мкМ) были исследованы с применением так называемой модели «стационарного старения». Данная модель основана на предположении о том, что культивируемые клетки при ограничении их пролиферации вследствие контактного торможения, т.е. достигнув стационарной фазы роста, начинают накапливать макромолекулярные повреждения, аналогичные тем, что накапливают клетки живого организма в течение жизни. Аппроксимация с использованием уравнения Гомпертца кривых выживаемости клеточных культур после достижения стационарной фазы роста позволяет моделировать процесс старения макроорганизма. Также использование данной модельной системы позволяет выявить наличие геропротекторных свойств у исследуемых препаратов [224].

На Рисунке 3.3 приведены данные о влиянии ЭМ орегано на кинетику роста и насыщающую плотность культуры клеток китайского хомячка. Видно, что при малой концентрации эфирного масла кинетика роста и насыщающая плотность культуры клеток китайского хомячка не отличались от контроля. Большая концентрация препарата согласно модели, приведенной в [225, 226], вызывала увеличение "биологического возраста" исследованных клеток, т.е. действовала как геропромотор.

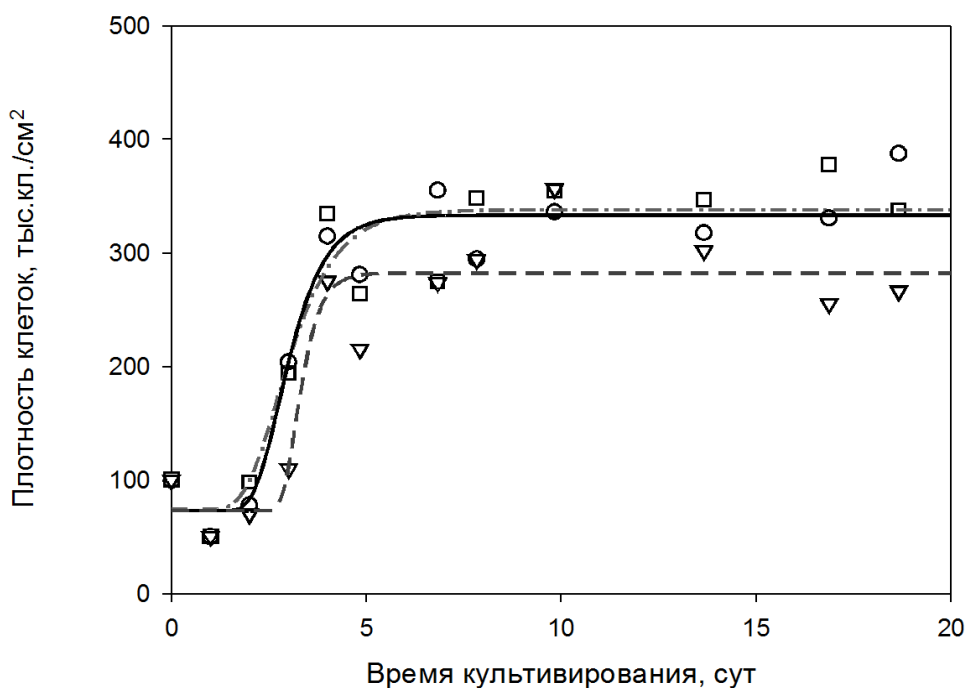


Рисунок 3.3. Влияние эфирного масла орегано в концентрации 25 мкМ и 250 мкМ (в пересчете на карвакрол) на кинетику роста и насыщающую плотность в культуре клеток китайского хомячка (□, контроль; ○, 25 мкМ; ▽, 250 мкМ).

Кривые аппроксимированы с помощью уравнения Гомпертца (— контроль; —•— 25 мкМ; — — 250 мкМ)

На Рисунке 3.4 приведены результаты исследования влияния ЭМ орегано на кинетику гибели клеток в модели "стационарного старения" [224, 227]. Эти данные также аппроксимированы 4-параметрическим уравнением Гомпертца. Очевидно, что ЭМ орегано в меньшей концентрации не влияет на ход экспериментальной кривой, в то время как в большей концентрации ощутимо ускоряет "стационарное старение" клеток. Судя по всему, в рамках этой

модельной системы ЭМ орегано в концентрации 250 мкМ ведет себя как геропромотор, а в концентрации 25 мкМ не влияет на жизнеспособность клеток.

Дополнительной иллюстрацией ингибирующего действия ЭМ орегано в концентрации 250 мкМ на пролиферативную активность клеток китайского хомячка могут служить фотографии типичных колоний, приведенные на Рисунке 3.5. Видно, что и размер, и форма колоний значительно изменяются лишь под воздействием ЭМ орегано в большей концентрации.

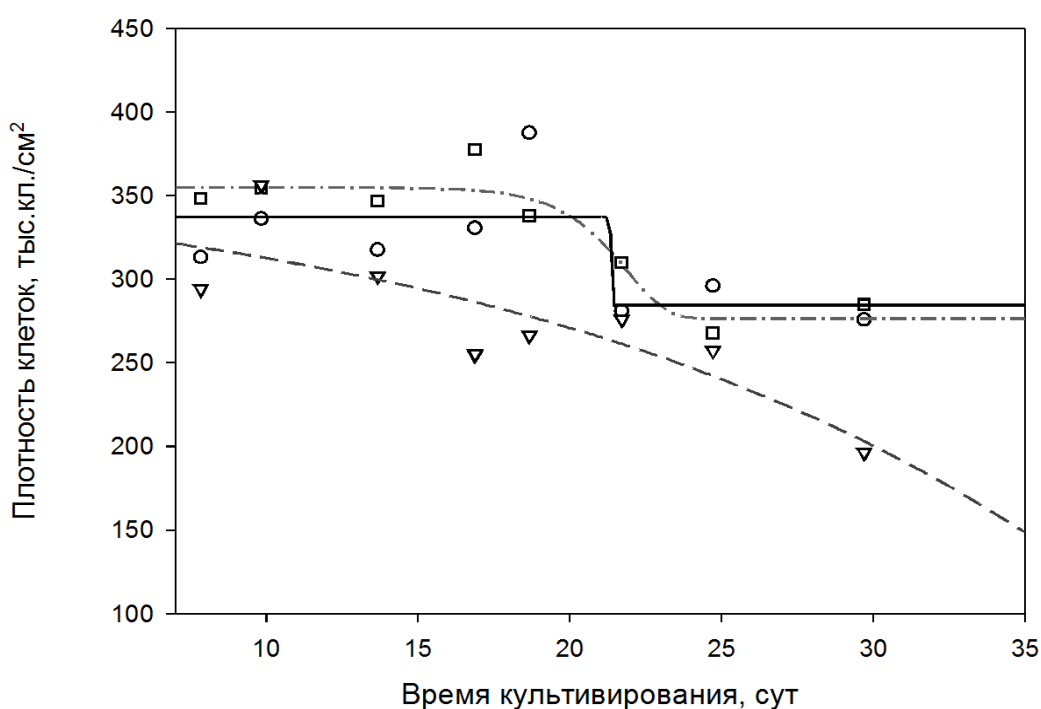


Рисунок 3.4. Влияние эфирного масла орегано в концентрации 25 мкМ и 250 мкМ (в пересчете на карвакрол) на кинетику гибели клеток в модели "стационарного старения" (□, контроль; ○, 25 мкМ; ▽, 250 мкМ). Кривые аппроксимированы с помощью уравнения Гомпертца (— контроль; —•— 25 мкМ; — — 250 мкМ)

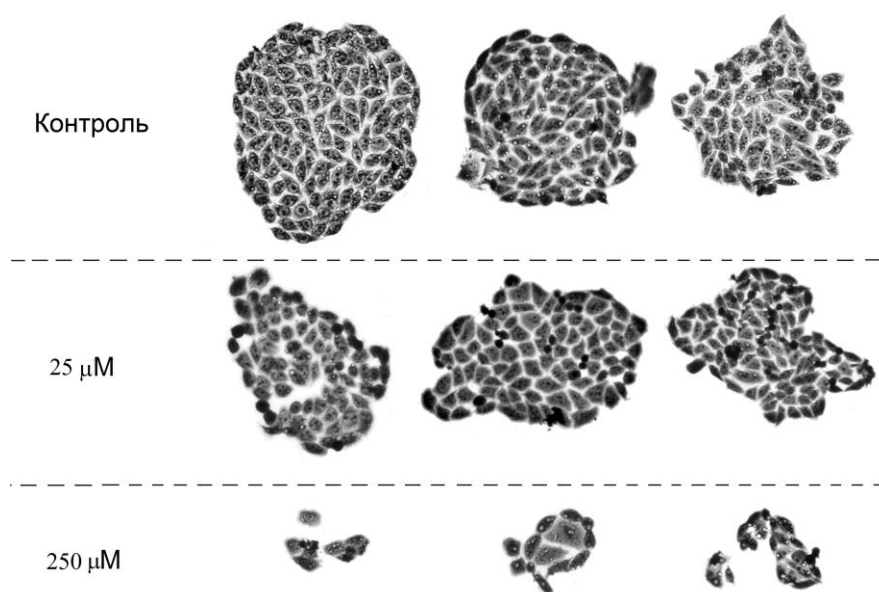


Рисунок 3.5. Влияние эфирного масла орегано в концентрации 25 мкМ и 250 мкМ (в пересчете на карвакрол) на общий вид колоний клеток китайского хомячка

Полученные данные свидетельствуют о том, что ЭМ орегано при концентрации в среде, соответствующей менее 10 мкг/мл (25 мкМ карвакрола), не обладало цитотоксичностью. Такое содержание карвакрола соответствует приблизительно 10 мкг эфирного масла орегано. Следует отметить, что в экспериментах на животных мы использовали водные растворы, в которых концентрации эфирного масла орегано были приблизительно в 400 раз меньше тех, что тестировались на клетках.

Таким образом, можно сказать о том, что ЭМ орегано заведомо было не токсично для клеток животных, получавших его с питьевой водой. Использование модели «стационарного старения» не обнаружило у ЭМ орегано способности замедлять старение клеток китайского хомячка.

Следовательно, выявленное увеличение продолжительности жизни мышей под действием ЭМ орегано может определяться только некоторыми функциональными изменениями на организменном уровне, но не связано с какой-либо геропротекторной активностью препарата, проявляющейся на клеточном уровне и вызывающей улучшение жизнеспособности клеток. Возможно, геропротекторное действие масла орегано *in vivo* связано с его бактерицидным или противоопухолевым действием [9, 221, 228]. Кроме того, не исключено, что оно, будучи биологически активной субстанцией, лишь запускает некоторые вторичные защитные механизмы в организме [227], не влияя непосредственно на жизнеспособность конкретных

клеток-мишеней. И, наконец, можно также допустить, что мы просто не смогли найти нужную концентрацию ЭМ орегано, необходимую для проявления геропротекторного действия на клеточном уровне.

3.1.3. Влияние эфирного масла орегано на состояние иммунокомпетентных органов мышей Balb/c

Как известно, одной из первых на любые возмущения экзо- или эндогенной природы реагирует иммунная система организма. Токсическое воздействие, как правило, сопровождается изменением функциональной активности иммунокомпетентных органов и увеличением их размеров, а также изменением соотношения различных типов лейкоцитов на лейкограмме. Стоит отметить, однако, что изменения массы иммунокомпетентных органов происходят также и в норме и зависят от возраста.

Данные, представленные на Рисунке 3.6А, демонстрируют рост массы тела животных с увеличением возраста. Сравнение контрольной и опытных групп мышей в разном возрасте не выявило влияния приема орегано на массу тела.

Из Рисунка 3.6Б можно видеть, что размеры тимуса мышей уменьшаются с увеличением возраста, как у опытных, так и у контрольных животных. Отсутствие статистически значимых отличий между опытными и контрольной группами животных на разных сроках жизни свидетельствует о том, что прием ЭМ орегано не влиял на размер тимуса мышей.

Как видно из Рисунка 3.6В, с увеличением возраста масса селезенки монотонно снижалась у мышей контрольной группы и у мышей, принимавших ЭМ орегано в малой дозе, и к возрасту 9 мес уменьшилась на 30% по сравнению с весом селезенки у молодых мышей. В группе, принимавшей масло в большей дозе, масса селезенки, напротив, увеличилась к 5 месяцам, затем снизилась и к 9 месяцам достигла размеров селезенки 2-месячных мышей, но при этом осталась выше на 20%, чем вес селезенки у мышей соответствующего возраста в контрольной группе, и в группе, принимавшей малую дозу ЭМ орегано.

По данным работы [229], увеличение размеров селезенки под действием каких-либо биологически активных соединений может свидетельствовать об увеличении уровня иммунологической защиты. Таким образом, из полученных данных следует, что длительный прием эфирного масла орегано в дозе 0,3 мкг/сут мог положительно влиять на иммунную систему мышей. Это, в свою очередь, могло стать одним из факторов, способствовавших увеличению продолжительности жизни в опытной группе мышей.

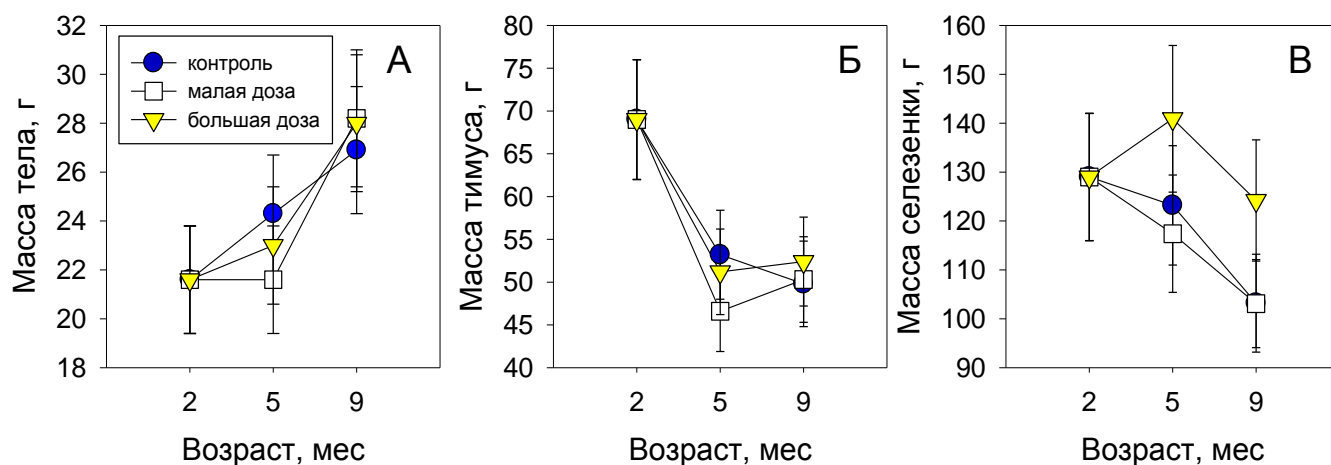


Рисунок 3.6. Масса тела (А), тимуса (Б) и селезенки (В) мышей линии Valb/c в контроле и при употреблении ЭМ орегано

Таким образом, нами показано, что эфирное масло орегано в изученных дозах не проявляет токсического действия как на клеточном, так и на организменном уровнях. Более того, обнаружено, что прием масла в большей дозе (3 мкг/сут) увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных на 120 дней. Результаты цитогеронтологического исследования эфирного масла орегано не выявили прямой геропротекторной активности препарата. Однако, это не отрицает наличия неких функциональных изменений в организме, ведущих к увеличению СПЖ мышей, для выяснения которых требуется оценить комплексную реакцию организма на действие препарата. Поэтому наши дальнейшие исследования были направлены на изучение физико-химических изменений в основных органах и тканях организма мышей, таких как кровь, печень и мозг, с увеличением возраста и при приеме ЭМ орегано.

3.1.4. Влияние ЭМ орегано на физико-химические характеристики эритроцитов мышей Valb/c с увеличением возраста

Как известно, важным свойством эфирных масел является их способность оказывать выраженный биологический эффект даже в низких концентрациях. Следовало ожидать, что регулярный ежедневный прием эфирного масла даже в малых дозах может привести к изменению функционирования органов и тканей мышей. В работе мы ставили две задачи: во-первых, оценить естественные возрастные изменения биохимических показателей органов и тканей здоровых мышей с возраста от 2 месяца до их глубокой старости (25 мес), так как такие

данные в литературе отсутствовали. Изучение качественных и количественных изменений биохимических характеристик органов и тканей интактных мышей, не получающих ЭМ орегано, позволило оценить динамику интенсивности окислительных процессов с увеличением возраста. Во-вторых, исследовать влияние приема эфирного масла орегано в двух дозах, различающихся на 4 порядка, на эти показатели. Ранее в работе [230] было подробно исследованы антирадикальные свойства различных ЭМ, в том числе ЭМ орегано в модельной системе. Показано, что ЭМ орегано обладало не только высокой антирадикальной активностью в этой системе, но его прием в течение 6 месяцев мышами влиял на параметры ПОЛ в органах мышей, как биоантиоксидант *in vivo*. Необходимо отметить, что в этих экспериментах не изучалось влияние длительного и непрерывного на протяжении всей жизни приема ЭМ орегано на биохимические характеристики органов мышей в разном возрасте. В настоящей работе мы определили влияние долгосрочного приема ЭМ орегано на параметры ПОЛ в эритроцитах, печени и мозге мышей Balb/c в возрасте 2, 5, 9, 16 и 25 месяцев.

Для оценки состояния мембран эритроцитов изучали степень механического гемолиза эритроцитов и содержание ТБК- активных продуктов в эритроцитах.

Известно, что характерным признаком «стареющего» эритроцита является изменение баланса фосфолипидов мембраны, нарушение их распределения между монослоями, уменьшение плотности упаковки [231]. В последнем случае двойные связи ненасыщенных жирных кислот становятся более доступными для атаки кислородными радикалами, что ведет к усилению перекисного окисления липидов, а это в свою очередь, способствует увеличению чувствительности эритроцитов к механическому воздействию [232, 233].

На Рисунке 3.7 представлены данные, демонстрирующие степень спонтанного гемолиза, который характеризует механическую резистентность эритроцитов мышей. Можно видеть, что к концу жизни мышей этот параметр снижался практически в 2 раза по сравнению со степенью гемолиза эритроцитов у более молодых животных, что свидетельствует о повышении резистентности мембраны эритроцита с увеличением возраста к механическому воздействию. Аналогичное снижение степени гемолиза эритроцитов у пожилых людей по сравнению с молодыми было обнаружено ранее в работе [234]. Длительный прием ЭМ орегано не влиял на степень гемолиза эритроцитов вплоть до возраста 9-ти месяцев. Начиная с этого возраста прием масла орегано как в малой, так и в большой дозе, приводил к снижению степени гемолиза эритроцитов мышей в среднем на 65% в возрасте 16-ти месяцев и на 40% в возрасте 25-ти месяцев по сравнению с соответствующим возрастным контролем. В ранее проведенном исследовании [230] было обнаружено снижение степени гемолиза на 14 % при приеме ЭМ орегано у мышей в возрасте 6 мес.

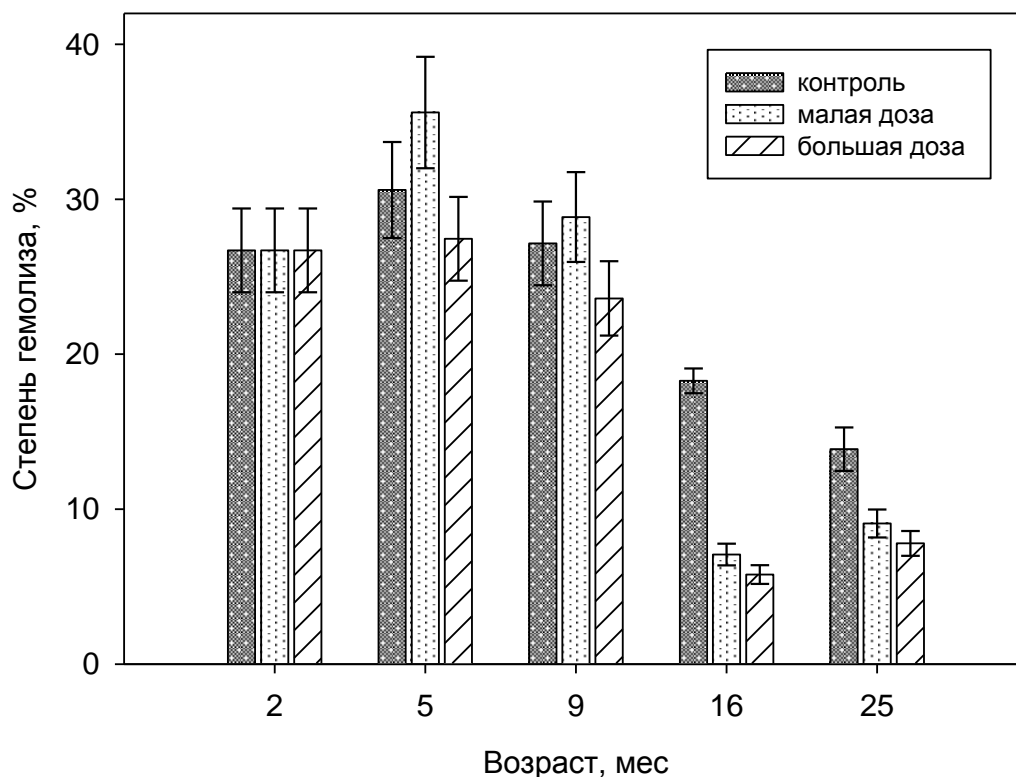


Рисунок 3.7. Степень гемолиза эритроцитов мышей Balb/c с увеличением возраста и при приеме ЭМ орегано в разных дозах

Оценку интенсивности процесса ПОЛ в эритроцитах проводили, определяя содержание ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида – МДА). Известно, что с увеличением возраста наблюдается дефицит системы антиоксидантной защиты, что приводит к окислительной модификации, в первую очередь, липидной компоненты мембран клеток и увеличению продуктов ПОЛ. На Рисунке 3.8 приведены данные по содержанию ТБК-АП в эритроцитах мышей. Видно, что по мере увеличения возраста этот параметр монотонно снижался и к 9-ти месячному возрасту составил 45% от его исходной величины у 2-х месячных животных (контрольная группа мышей). По мере старения происходило значительное увеличение содержания ТБК-АП в эритроцитах: в возрасте 16-ти и 25-ти месяцев значение этого показателя превысило исходный уровень у молодых животных почти на 50%. Полученные нами результаты хорошо согласуются с известными данными о возрастном увеличении содержания ТБК-АП, кроме того, существуют и сезонные колебания продуктов ПОЛ в организме мышей [235].

Как видно из Рисунка 3.8, прием масла орегано в обеих дозах не оказывал существенного влияния на содержание ТБК-АП в эритроцитах мышей в возрасте 5 и 9 месяцев. В экспериментах, проведенных в другие годы с мышами той же линии, однако, было отмечено снижение содержания ТБК-АП в эритроцитах при приеме ЭМ орегано у 6-ти месячных мышей [230]. С увеличением возраста мышей до 16 и 25 месяцев, как видно из Рисунка 3.8, наблюдалось значительное увеличение содержания ТБК-АП в эритроцитах мышей, но различия в этом параметре для контрольной и опытных групп не выходили за пределы ошибки опыта.

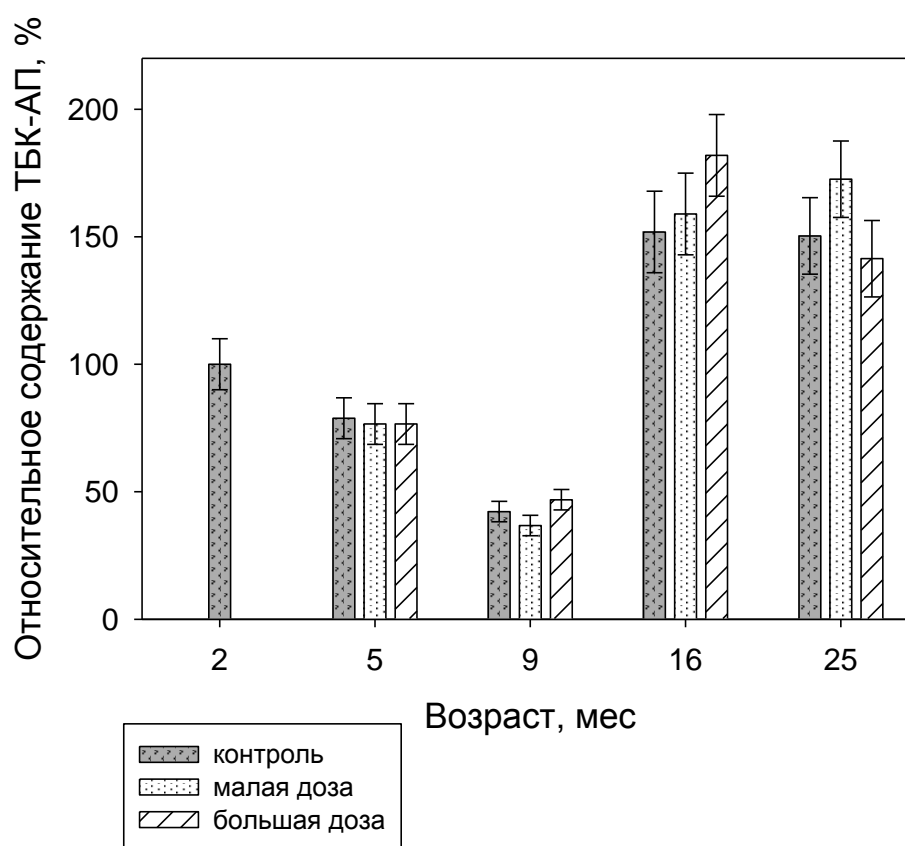


Рисунок 3.8. Относительное содержание ТБК-АП в эритроцитах мышей Balb/c с увеличением возраста и при приеме ЭМ орегано в разных дозах

Итак, с увеличением возраста у мышей происходило монотонное снижение степени гемолиза эритроцитов, то есть увеличение устойчивости их мембран к спонтанному механическому гемолизу. В то же время к концу жизни увеличивался уровень ПОЛ (по содержанию ТБК-АП).

Длительный прием эфирного масла орегано изменял биохимические показатели эритроцитов мышей в зависимости от введенной дозы ЭМ. Найдено, что степень гемолиза у опытных животных постепенно снижалась аналогично тому, как это происходило у контрольных животных с увеличением возраста до 9 месяцев. Дальнейший прием ЭМ орегано снижал уровень гемолиза у мышей как в малой, так и в большой дозе. Количество ТБК-АП в эритроцитах на протяжении всей жизни у мышей обеих опытных групп изменялось так же, как и в контрольной группе. К возрасту 25 месяцев содержание ТБК-АП у опытных животных было немного ниже, чем в контроле.

3.1.5. Возрастные изменения состава жирных кислот, показателей ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в печени мышей Balb/c и влияние эфирного масла орегано на эти параметры

Ключевую роль в метаболизме клетки и в структурном и функциональном состоянии клеточных мембран играют липиды и входящие в их состав насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. (ЖК). Изменение ЖК состава мембран, а именно соотношения насыщенных и ненасыщенных ЖК, приводит к изменению подвижности липидного бислоя, что, в свою очередь, влияет на активность мембранных белков (ферментов, рецепторов, ионных каналов) и, таким образом, сказывается на регуляции клеточного метаболизма в целом. Известно, что при изменении физических условий окружающей среды (температура, давление), влияющих на фазовое состояние и динамическую подвижность липидов в мембране, клетка оказывает адаптивный ответ, модифицировав химический состав липидов и содержание отдельных жирных кислот [236].

Нами был изучен жирнокислотный состав печени и мозга мышей с возрастом и при приеме ЭМ орегано. На Рисунке 2.2 в качестве примера приведена хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), выделенных из гомогената печени мышей контрольной группы в возрасте 25 месяцев. В Таблице 3.2 приведен состав ЖК печени мышей в возрасте от 2 до 25 месяцев. Видно, что основными жирными кислотами в липидах печени с содержанием более 10% от суммы всех ЖК являются насыщенные пальмитиновая и стеариновая кислоты, мононенасыщенная олеиновая кислота, а также линолевая и арахидоновая из группы полиненасыщенных кислот. По мере старения доля насыщенных жирных кислот в печени мышей монотонно уменьшалась с 34,9 % до 31,2%, т.е. на 3,7%. Суммарное содержание мононенасыщенных ЖК увеличивалось с 23,5% в возрасте 2-х месяцев до 30,7% в возрасте 9 месяцев, затем снижалось до уровня 2- месячных мышей. Содержание полиненасыщенных

кислот также варьировало по мере старения мышей, но в возрасте 25 месяцев доля этих кислот была такой же, как и у 2- месячных мышей (Таблица 3.2).

Уровень физиологических колебаний содержания отдельных насыщенных жирных кислот в изученном возрастном диапазоне не превышал 4%, мононенасыщенных – 5%, полиненасыщенных – 3%. Такие изменения считаются незначительными, они только в 2 раза превышают относительную погрешность в определении содержания кислот. Известно, что на состав жирных кислот в печени может оказывать сильное влияние состав корма. Полученные нами данные позволяют считать, что были соблюдены стандартные режимы содержания и кормления мышей на протяжении всей жизни.

Длительное и регулярное употребление эфирного масла орегано с питьевой водой в обеих дозах не приводило к существенному изменению суммарного содержания каждого класса кислот, их содержание, так же как и содержание отдельных основных ЖК, варьировало в пределах, установленных для возрастных изменений (Таблица 3.2). Следует лишь отметить незначительное превышение таких пределов в содержании мононенасыщенных и снижении полиненасыщенных жирных кислот в печени мышей в возрасте 25 месяцев по сравнению с контролем того же возраста.

Таблица 3.2.

Состав жирных кислот печени с увеличением возраста и при приеме эфирного масла орегано у мышей Balb/c

Кислота	Группа мышей	Содержание жирных кислот в печени мышей в разном возрасте, % отн.				
		2 мес	5 мес	9 мес	16 мес	25 мес
Насыщенные жирные кислоты (НЖК)						
16:0	К	22,56±0,68	22,55±0,68	22,00±0,66	19,49±0,58	18,77±0,56
	МД	—	21,72±0,65	21,74±0,65	20,58±0,62	22,00±0,66
	БД	—	22,64±0,68	22,42±0,67	23,30±0,70	20,12±0,60
17:0	К	0,25±0,01	0,25±0,01	0,23±0,01	0,26±0,01	0,28±0,01
	МД	—	0,13±0,00	0,22±0,01	0,30±0,01	0,23±0,01
	БД	—	0,28±0,01	0,21±0,01	0,26±0,01	0,22±0,01
18:0	К	11,29±0,34	10,63±0,32	10,77±0,32	11,14±0,33	11,65±0,35
	МД	—	11,65±0,35	11,04±0,33	11,86±0,36	10,15±0,30
	БД	—	13,0±0,39	10,36±0,31	11,10±0,33	10,22±0,31
20:0	К	0,10±0,00	0,09±0,00	0,04±0,00	0,13±0,00	0,15±0,00
	МД	—	0,08±0,00	0,08±0,00	0,11±0,00	0,11±0,00
	БД	—	0,10±0,00	0,09±0,00	0,14±0,00	0,12±0,00
22:0	К	0,30±0,01	0,25±0,01	0,21±0,01	0,19±0,00	0,11±0,00
	МД	—	0,25±0,01	0,22±0,01	0,26±0,01	0,29±0,01
	БД	—	0,31±0,01	0,21±0,01	0,36±0,01	0,31±0,01

Продолжение Таблицы 3.2

23:0	К	0,15±0,00	0,12±0,00	0,16±0,00	0,13±0,00	0,07±0,00
	МД	—	0,10±0,00	0,14±0,00	0,17±0,00	0,17±0,00
	БД	—	0,17±0,00	0,14±0,00	0,26±0,01	0,49±0,01
24:0	К	0,25±0,01	0,21±0,01	0,18±0,00	0,18±0,00	0,21±0,01
	МД	—	0,23±0,01	0,20±0,01	0,21±0,01	0,38±0,01
	БД	—	0,28±0,01	0,17±0,00	0,36±0,01	0,38±0,01
Σ НЖК	К	34,90	34,10	33,59	31,52	31,24
	МД	—	34,16	33,64	33,49	33,33
	БД	—	36,78	33,60	35,78	31,86
Мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК)						
16:1ω9	К	0,32±0,01	0,35±0,01	0,35±0,01	0,42±0,01	0,35±0,01
	МД	—	0,27±0,01	0,34±0,01	0,38±0,01	0,34±0,01
	БД	—	0,28±0,01	0,37±0,01	0,22±0,01	0,34±0,01
16:1ω7	К	1,98±0,06	1,99±0,06	3,35±0,10	2,40±0,07	1,77±0,05
	МД	—	1,52±0,04	3,09±0,09	1,81±0,05	2,65±0,07
	БД	—	1,45±0,04	3,50±0,11	3,19±0,10	2,13±0,06
18:1ω9	К	16,42±0,49	16,64±0,50	21,85±0,66	21,41±0,64	17,96±0,54
	МД	—	14,86±0,45	20,12±0,69	18,86±0,57	18,97±0,57
	БД	—	13,88±0,42	22,07±0,66	19,46±0,58	20,34±0,61
18:1ω7	К	3,79±0,11	2,75±0,07	4,34±0,13	3,74±0,11	2,85±0,09
	МД	—	2,27±0,07	4,60±0,14	3,56±0,11	3,59±0,11
	БД	—	2,90±0,09	5,24±0,16	4,23±0,13	3,82±0,11
20:1ω9	К	0,40±0,01	0,35±0,01	0,41±0,01	0,41±0,01	0,56±0,01
	МД	—	0,29±0,01	0,40±0,01	0,45±0,01	0,46±0,01
	БД	—	0,34±0,01	0,43±0,01	0,41±0,01	0,70±0,02
20:1ω7	К	0,02±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00
	МД	—	0,02±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00
	БД	—	0,03±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,06±0,00
24:1ω9	К	0,59±0,01	0,35±0,01	0,37±0,01	0,33±0,01	0,38±0,01
	МД	—	0,43±0,01	0,44±0,01	0,45±0,01	0,67±0,02
	БД	—	0,48±0,01	0,36±0,01	0,62±0,02	0,81±0,02
Σ МНЖК	К	23,52	22,45	30,71	28,76	23,91
	МД	—	19,66	29,03	25,55	26,69
	БД	—	19,36	32,01	28,18	28,20
Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК)						
18:2ω6	К	14,49±0,43	19,36±0,58	14,45±0,43	17,25±0,52	15,47±0,46
	МД	—	18,65±0,56	14,08±1,23	15,02±0,45	14,12±0,42
	БД	—	15,50±0,47	13,38±0,40	13,74±0,41	13,10±0,39
20:2ω6	К	0,35±0,01	0,37±0,01	0,27±0,01	0,26±0,01	0,32±0,01
	МД	—	0,31±0,01	0,28±0,01	0,32±0,01	0,31±0,01
	БД	—	0,34±0,01	0,28±0,01	0,26±0,01	0,36±0,01
18:3ω6	К	0,15±0,00	0,28±0,01	0,18±0,00	0,28±0,01	0,17±0,00
	МД	—	0,27±0,01	0,17±0,00	0,21±0,01	0,15±0,00
	БД	—	0,21±0,01	0,15±0,00	0,17±0,00	0,16±0,00

Продолжение Таблицы 3.2.

20:3ω6	К	1,31±0,01	1,09±0,1	0,98±0,02	0,90±0,02	0,94±0,02
	МД	—	0,93±0,02	1,09±0,03	0,98±0,02	0,84±0,02
	БД	—	1,24±0,04	1,05±0,03	1,22±0,04	0,94±0,02
20:4ω6	К	15,75±0,47	12,99±0,39	13,05±0,39	13,86±0,42	15,54±0,47
	МД	—	14,78±0,44	14,40±0,43	16,04±0,48	14,47±0,43
	БД	—	16,15±0,48	13,00±0,39	13,36±0,40	15,00±0,45
22:4ω6	К	0,72±0,02	0,69±0,02	0,57±0,01	0,64±0,02	0,95±0,02
	МД	—	0,75±0,02	0,60±0,01	0,77±0,02	0,69±0,02
	БД	—	0,52±0,01	0,52±0,01	0,72±0,02	0,91±0,02
22:5ω3	К	0,40±0,01	0,44±0,01	0,60±0,01	0,33±0,01	0,58±0,01
	МД	—	0,47±0,01	0,64±0,02	0,41±0,01	0,42±0,01
	БД	—	0,31±0,01	0,61±0,02	0,38±0,01	0,52±0,01
22:5ω6	К	1,49±0,04	0,55±0,01	0,34±0,01	0,71±0,02	0,78±0,02
	МД	—	0,53±0,01	0,39±0,01	1,07±0,03	0,69±0,02
	БД	—	0,69±0,02	0,35±0,01	0,82±0,02	0,83±0,02
22:6ω3	К	6,91±0,21	7,72±0,23	5,28±0,16	5,40±0,16	8,59±0,26
	МД	—	9,37±0,28	5,74±0,17	6,14±0,18	7,70±0,23
	БД	—	8,91±0,27	4,99±0,15	5,36±0,16	7,99±0,24
Σ ПНЖК	К	41,47	43,49	35,70	39,63	43,34
	МД	—	46,06	37,33	40,96	39,39
	БД	—	43,87	34,39	36,03	39,81

Примечание: К – контрольная группа мышей, МД – опытная группа мышей, принимавшая малую дозу ЭМ орегано (0,015 нг/мл), БД – опытная группа мышей, принимавшая большую дозу эфирного масла орегано (0,15 мкг/мл).

Длительное и регулярное употребление эфирного масла орегано с питьевой водой в обеих дозах не приводило к существенному изменению суммарного содержания каждого класса кислот, их содержание, так же как и содержание отдельных основных ЖК, варьировало в пределах, установленных для возрастных изменений (Таблица 3.2). Следует лишь отметить незначительное превышение таких пределов в содержании мононенасыщенных и снижении полиненасыщенных жирных кислот в печени мышей в возрасте 25 месяцев по сравнению с контролем того же возраста.

На Рисунке 3.9 приведено содержание ТБК-АП в печени мышей, принимавших ЭМ орегано. Как видно, при приеме обеих доз эфирного масла отмечено достоверное снижение уровня ТБК-АП в опытных группах мышей по сравнению с контролем, но более значительно в случае приема малой дозы ЭМ орегано: на 26% у мышей в возрасте 16 месяцев и на 23% у мышей в возрасте 25 месяцев. Это свидетельствует о том, что эфирное масло орегано в малых дозах проявляет свойства биоантиоксиданта, так как его регулярный прием увеличивал устойчивость липидов печени к окислению.

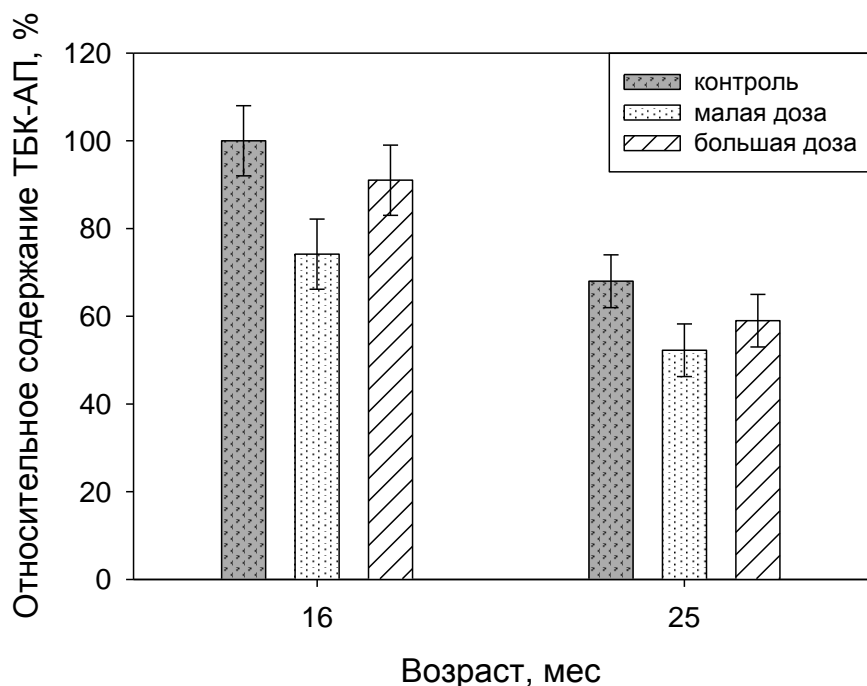


Рисунок 3.9. Относительное содержание ТБК-АП в печени мышей Balb/c при приеме ЭМ орегано

Антиоксидантная система защиты против эндогенного и экзогенного окислительного стресса в клетках печени включает в себя группу ферментов и таких низкомолекулярных соединений, как витамины, восстановленный глутатион и др., предотвращающих избыток генерации активных форм кислорода. Супероксиддисмутазы (Cu,Zn-СОД и Mn-СОД) и глутатионпероксидаза (ГП) рассматриваются как ферменты первой линии защиты клеток. Они представляют собой единую цепь, в которой СОД превращает супероксидный радикал в пероксид водорода, тогда как ГП превращает H_2O_2 в H_2O . Мы исследовали активности АО ферментов - Cu,Zn-СОД и Mn-СОД, ГП и фермента биотрансформации ксенобиотиков – глутатион-S-трансферазы (ГТ) в митохондриях и цитозоле печени мышей. Активности ферментов измеряли в возрасте 5, 9 и 16 месяцев и выражали в относительных единицах (по отношению к контролю). Исследование показало, что чувствительность ферментов к действию эфирного масла зависела от локализации фермента (цитозоль и митохондрии), дозы ЭМ орегано и длительности его приема (Таблица 3.3).

Как видно из Таблицы 3.3, прием эфирного масла в БД приводил к устойчивой индукции активности ГП в цитозоле в течение всего срока наблюдения (16 месяцев). Активность ГП в митохондриях печени увеличивалась в 1,8 раза к возрасту 9 месяцев, затем была близка к

контролю. Противоположные изменения активностей СОД в печени мышей найдены в цитозоле и митохондриях. Активность Cu,Zn-СОД увеличивалась в цитозоле печени мышей в возрасте 9 месяцев, затем снижалась. Активность Mn-СОД в митохондриях существенно снижалась у 5-месячных мышей, но к 16-месячному возрасту увеличивалась.

Таблица 3.3.

Активность антиоксидантных ферментов в печени мышей Balb/c увеличением возраста и при приеме ЭМ орегано

Доза ЭМ	Отношение активности, опыт/контроль					
	5 мес	9 мес	16 мес	5 мес	9 мес	16 мес
	СОД цитозоля			СОД митохондрий		
БД	1,10	1,45	0,70	0,40	0,98	1,10
МД	1,27	1,21	1,20	1,11	0,94	1,00
	ГП цитозоля			ГП митохондрий		
БД	1,50	1,43	1,45	1,38	1,82	0,93
МД	0,80	1,20	0,78	1,17	1,54	0,75
	ГТ цитозоля			ГТ митохондрий		
БД	2,11	0,70	1,04	1,65	1,30	1,30
МД	1,48	0,65	0,61	2,35	1,30	0,87
	СОД/ГП цитозоля			СОД/ГП митохондрий		
БД	0,7	1,0	0,5	0,3	0,5	1,3
МД	1,6	1,0	1,5	0,9	0,6	1,3

Прием эфирного масла в МД увеличивал активность фермента ГП митохондрий в 1,5 раза к 9 месяцам, но в меньшей степени влиял на активность этого фермента в цитозоле. Употребление орегано в МД также слабо влияло на активность СОД в цитозоле и в митохондриях.

Для оценки функционирования ферментов как единой системы использовали отношение активностей СОД/ГП. Из Таблицы 3.3 видно, что этот параметр при действии ЭМ орегано в БД в митохондриях был снижен почти в 3 раза у молодых мышей, но с увеличением возраста он повышался. В цитозоле, напротив, существенное изменение отношения СОД/ГП (~ в 2 раза) обнаружили у взрослых мышей в возрасте 16 месяцев. Сниженные значения параметра СОД/ГП коррелируют с большей устойчивостью к окислительному стрессу. При приеме ЭМ орегано в малой дозе отмечено повышение соотношения СОД/ГП в цитозоле у 5-

месячных и 16-месячных животных, тогда как в митохондриях наблюдали снижение этого параметра у мышей 9-месячного возраста.

Глутатионтрансфераза является ферментом, защищающим печень от вредного действия ксенобиотиков. Как видно из таблицы, обе дозы эфирного масла приводили к однотипному изменению активностей ГТ в цитозоле и митохондриях. Активность ГТ была увеличена в печени только у 5-ти месячных мышей, затем ее активность приходила к норме (в митохондриях) или снижалась ниже контроля (в цитозоле). Следует отметить, что наибольший эффект (рост активности ГТ более, чем в 2 раза) достигался при приеме ЭМ в БД в цитозоле и ЭМ в МД в митохондриях. Было показано, что в печени крыс, получавших с кормом тимол или эфирное масло тимьяна, активность супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы была значительно выше, чем в контрольной группе. Общий антиоксидантный статус крыс из опытных групп был выше на 61-71% по сравнению с контролем [237]. Известно, что способность природных соединений индуцировать активность детоксифицирующих ферментов, в том числе ГТ, коррелирует с их противораковой активностью. В связи с этим индукция ГТ при систематическом приеме эфирного масла орегано может свидетельствовать о том, что это масло может рассматриваться в качестве потенциального ингибитора опухолевых процессов.

Полученные данные свидетельствуют о модуляции ферментативной защитной системы печени мышей при приеме эфирного масла орегано. Индукция защитных ферментов, вызываемая действием масла, зависела от локализации фермента, дозы препарата и длительности его употребления. Известно, что баланс в системе АО ферментов важен для поддержания гомеостаза в клетке. Совокупность полученных данных показала, что в отсутствие экзогенного окислительного стресса эфирное масло вызывало изменения в балансе АО ферментов, оказывало позитивное влияние на АО статус и, тем самым, формировало устойчивость печени мышей к окислительному стрессу. В результате мы наблюдали снижение содержания продуктов ПОЛ: величины ТБК-АП в опытных группах были ниже, чем в контрольной. Длительное регулярное употребление эфирного масла с питьевой водой, по нашему мнению, не приводило к существенному изменению синтеза и метаболизма жирных кислот в печени мышей, так как мы не нашли существенных различий в содержании основных ЖК. Суммарное содержание каждого класса кислот, так же как и содержание отдельных основных ЖК, варьировало в пределах, установленных для возрастных изменений. Эфирное масло орегано не проявляло токсических эффектов в печени мышей, проявляло свойства биоантиоксиданта, индуцируя активность АО ферментов и снижая уровень продуктов ПОЛ.

3.1.6. Возрастные изменения в составе жирных кислот в мозге мышей линии Balb/c и влияние эфирного масла орегано на эти параметры

Жирные кислоты (ЖК) играют главную роль в формировании структуры клеточных мембран мозга. Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембранах определяет их функциональные свойства, влияет на текучесть, объем и упаковку мембран, изменяет свойства липидной фазы, модифицирует белок-липидные взаимодействия в специфичных микродоменах. Важнейшей кислотой в мозге является докозагексаеновая кислота 22:6 ω 3, которая является основной по содержанию в классе ω 3 кислот. Дефицит кислот этого класса изменяет способность белков мембраны связывать лиганды, влияет на активность ферментов и рецепторов, распознавание антигенов, передачу сигналов, подвижность липидного бислоя. Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) содержат метилен-прерывающиеся двойные связи, которые делают их доступными для атаки свободными радикалами. В живых системах продуцирование свободных радикалов увеличивается с возрастом, в это же время активность антиоксидантных ферментов снижается. В ряде исследований было установлено, что с увеличением возраста доля ПНЖК в фосфолипидах мозга уменьшается, что влияет на его функции [238, 239]. Можно предполагать, что добавление в рацион стареющих животных природных антиоксидантов будет способствовать повышению антиоксидантного статуса организма и влиять на состав жирных кислот мозга.

Состав жирных кислот мозга мышей контрольной группы с увеличением возраста приведен в Таблице 3.4. Видно, что суммарное содержание насыщенных жирных кислот у 2-месячных мышей составляло 47,6%, при этом основными по содержанию были кислоты C16 (22,9%) и C18 (22,7%). С возрастом доля суммы насыщенных кислот монотонно снижалась и через 25 месяцев составляла 40,2%, то есть в 1,2 раза меньше, чем в мозге 2-месячных животных. Однако содержание кислоты C18 уменьшалось с увеличением возраста мышей только на 2%, тогда как доля C16 снижалась значительно – с 22,9% до 16,9%, то есть в 1,4 раза. Доля мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) в мозге молодых мышей составляла 22,8% по отношению к сумме всех ЖК, при этом основной по содержанию была олеиновая кислота 18:1 ω 9. Суммарное содержание двух МНЖК 18:1 ω 7 и 18:1 ω 9 было 18%, по 2% содержалось МНЖК с 20 и 24 атомами углерода (Таблица 3.4). Содержание МНЖК повышалось с увеличением возраста мышей до 16 месяцев, затем этот процесс стабилизировался, и уровень мононенасыщенных жирных кислот в мозге старых мышей был в 1,4 раза выше, чем у молодых животных в возрасте 2 месяцев. Аналогичным образом изменялось содержание основной в этом классе олеиновой кислоты. Более значительным изменениям подвергались мононенасыщенные кислоты с 20, 22 и 24 атомами углерода. Их содержание увеличивалось в процессе старения

мышей в 2-2,5 раза, но так как доля этих кислот была невелика (не превышала 2%), то динамика изменения суммарного содержания этого класса кислот совпадала с изменением содержания только олеиновой кислоты. Доля ПНЖК в мозге молодых мышей составляла 29,2%, при этом основными кислотами были докозагексаеновая (22:6 ω 3, 15,5%) и арахидоновая (20:4 ω 6, 9,9%). Следует отметить, что в Таблице 3.4 приведено суммарное содержание докозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, так как эти кислоты плохо разделялись на неполярной фазе, но их соотношение составляло около 1:5, и далее мы рассматриваем их сумму как одну кислоту 22:6 ω 3. Как видно из Таблицы 3.4, суммарное содержание ПНЖК в мозге мышей увеличивалось до 6 месяцев, затем с увеличением возраста снижалось и в 25 месяцев оказалось в 1,1 раза меньше, чем у 2-месячных животных. Содержание отдельных кислот 22:6 ω 3 и 20:4 ω 6 в мозге мышей также снижалось в процессе старения. Наиболее сильным изменениям подвергались кислоты 20:3 ω 6 (снижение в 1,8 раза) и 22:4 ω 6 (увеличение к 25 месяцам в 1,3 раза).

Таким образом, в мозге стареющих животных значительно снижалось содержание насыщенных ЖК, в меньшей степени – полиненасыщенных ЖК, и значительно увеличивалось содержание мононенасыщенных ЖК. Приведенные данные по изменению содержания всех групп жирных кислот в мозге интактных мышей в течение длительного промежутка времени, а именно, от рождения до глубокой старости, получены впервые [240].

В Таблице 3.4 представлены данные по влиянию приема эфирного масла орегано на состав ЖК мозга мышей в возрасте от 5 до 25 месяцев. Доля НЖК с увеличением возраста уменьшалась, прием эфирного масла еще больше снижал долю этих кислот – в 1,5 раза при действии МД масла и в 1,2 раза в случае БД. Видно, что такое снижение уровня НЖК происходило за счет мажорных фракций жирных кислот – С16 и С18, особенно при приеме МД масла. Содержание минорных фракций, напротив, увеличивалось в процессе потребления масла в обеих дозах. При этом только содержание кислоты С20 при приеме МД масла возвращалось к уровню, который наблюдали у молодых животных.

Таблица 3.4.

Состав жирных кислот в мозге с увеличением возраста и при приеме эфирного масла орегано у мышей линии Balb/c

Кислота	Образец	Содержание ЖК, % отн.				
		2 мес	5 мес	9 мес	16 мес	25 мес
16:0	К	22,94 \pm 0,69	20,45 \pm 0,62	17,73 \pm 0,53	17,12 \pm 0,51	16,95 \pm 0,51
	МД	—	21,44 \pm 0,64	18,16 \pm 0,55	16,63 \pm 0,50	11,31 \pm 0,34
	БД	—	17,31 \pm 0,52	17,57 \pm 0,53	15,02 \pm 0,45	17,12 \pm 0,51

Продолжение Таблицы 3.4.

18:0	К	22,72±0,68	22,48±0,67	21,21±0,64	20,22±0,61	20,54±0,62
	МД	—	21,95±0,66	21,84±0,65	20,58±0,62	17,96±0,54
	БД	—	20,58±0,62	21,26±0,64	19,00±0,57	19,00±0,57
20:0	К	0,60±0,01	0,47±0,01	0,59±0,01	0,75±0,02	0,45±0,01
	МД	—	0,40±0,01	0,55±0,01	0,61±0,02	0,69±0,02
	БД	—	0,61±0,02	0,59±0,01	0,79±0,02	0,49±0,02
22:0	К	0,52±0,01	0,50±0,01	0,77±0,02	0,94±0,02	0,90±0,02
	МД	—	0,44±0,01	0,72±0,02	0,80±0,02	1,07±0,03
	БД	—	0,80±0,02	0,82±0,02	1,11±0,03	0,80±0,02
24:0	К	0,79±0,02	0,72±0,02	1,37±0,04	1,47±0,04	1,40±0,04
	МД	—	0,67±0,02	1,03±0,03	1,43±0,04	1,68±0,05
	БД	—	1,45±0,04	1,51±0,04	2,04±0,06	1,62±0,04
Σ НЖК	К	47,57	44,62	41,67	40,50	40,24
	МД	—	44,9	42,3	40,1	32,71
	БД	—	40,8	41,8	38,0	39,03
16:1ω9	К	0,45±0,01	0,47±0,01	0,43±0,01	0,78±0,02	1,15±0,03
	МД	—	0,47±0,01	1,08±0,03	0,67±0,02	0,45±0,01
	БД	—	0,37±0,01	0,43±0,01	0,47±0,01	0,47±0,01
18:1ω9	К	14,42±0,43	15,41±0,46	15,70±0,47	17,86±0,54	17,65±0,53
	МД	—	14,85±0,45	16,14±0,48	17,17±0,51	14,36±0,43
	БД	—	15,39±0,46	15,87±0,48	19,34±0,58	14,58±0,44
18:1ω7	К	3,62±0,11	3,39±0,10	3,54±0,11	3,92±0,12	3,94±0,12
	МД	—	3,49±0,11	3,49±0,11	3,73±0,11	2,83±0,08
	БД	—	3,41±0,10	3,60±0,11	4,00±0,12	3,30±0,99
20:1ω9	К	1,64±0,49	2,53±0,75	2,62±0,78	3,52±0,11	2,99±0,09
	МД	—	1,67±0,51	2,54±0,75	2,68±0,08	3,34±0,10
	БД	—	2,66±0,78	2,60±0,78	4,26±0,13	2,07±0,62
20:1ω7	К	0,36±0,01	0,47±0,01	0,49±0,01	0,60±0,01	0,50±0,01
	МД	—	0,32±0,01	0,48±0,01	0,48±0,01	0,63±0,02
	БД	—	0,47±0,01	0,48±0,01	0,70±0,02	0,36±0,01
22:1ω9	К	0,17±0,00	0,16±0,00	0,25±0,01	0,25±0,01	0,45±0,01
	МД	—	0,12±0,00	0,23±0,01	0,22±0,01	0,42±0,01
	БД	—	0,28±0,02	0,24±0,01	0,32±0,02	0,22±0,01
22:1ω7	К	0,12±0,00	0,11±0,00	0,18±0,00	0,16±0,00	0,15±0,00
	МД	—	0,08±0,00	0,18±0,00	0,16±0,00	0,28±0,01
	БД	—	0,19±0,01	0,18±0,00	0,23±0,01	0,14±0,00
24:1ω9	К	2,00±0,06	1,93±0,06	4,50±0,13	5,14±0,15	5,03±0,15
	МД	—	1,87±0,06	3,59±0,11	4,55±0,14	5,83±0,17
	БД	—	3,69±0,11	4,64±0,14	6,97±0,21	5,74±0,17
Σ МНЖК	К	22,78	24,47	27,71	32,23	31,86
	МД	—	22,9	27,7	29,7	29,16
	БД	—	26,5	28,0	36,3	26,88
18:2ω6	К	0,52±0,01	1,68±0,05	0,50±0,01	0,78±0,02	0,75±0,02
	МД	—	0,63±0,02	0,48±0,01	0,80±0,02	0,35±0,01
	БД	—	0,61±0,02	0,60±0,01	0,67±0,02	0,66±0,02

Продолжение Таблицы 3.4.

20:2 ω 6	К	0,12 \pm 0,00	0,36 \pm 0,01	0,14 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00
	МД	—	0,12 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,18 \pm 0,00
	БД	—	0,19 \pm 0,01	0,13 \pm 0,00	0,15 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00
20:3 ω 6	К	0,36 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01
	МД	—	0,40 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,51 \pm 0,01
	БД	—	0,42 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01
20:4 ω 6	К	9,89 \pm 0,30	10,51 \pm 0,32	9,60 \pm 0,29	8,21 \pm 0,25	8,92 \pm 0,27
	МД	—	10,28 \pm 0,31	9,89 \pm 0,30	9,37 \pm 0,28	11,24 \pm 0,34
	БД	—	9,54 \pm 0,29	9,36 \pm 0,28	8,28 \pm 0,25	9,47 \pm 0,29
22:4 ω 6	К	2,84 \pm 0,09	3,00 \pm 0,09	3,5 \pm 0,11	3,95 \pm 0,12	3,79 \pm 0,11
	МД	—	2,98 \pm 0,09	3,64 \pm 0,11	3,60 \pm 0,11	4,20 \pm 0,13
	БД	—	3,88 \pm 0,12	3,26 \pm 0,10	3,27 \pm 0,10	3,83 \pm 0,11
22:5 ω 6 + 22:6 ω 3	К	15,45 \pm 0,47	17,06 \pm 0,51	16,00 \pm 0,48	13,13 \pm 0,39	13,26 \pm 0,37
	МД	—	17,39 \pm 0,52	15,08 \pm 0,45	15,42 \pm 0,46	18,55 \pm 0,56
	БД	—	17,59 \pm 0,53	15,86 \pm 0,47	12,07 \pm 0,36	18,80 \pm 0,56
Σ ПНЖК	К	29,18	32,97	30,10	26,41	27,07
	МД	—	31,8	29,6	29,6	35,03
	БД	—	32,2	29,5	24,7	33,15

Более важный вклад в свойства клеточных мембран и функции клеток мозга вносят моно- и полиненасыщенные жирные кислоты. Как видно из Таблицы 3.4, с увеличением возраста суммарное содержание всех МНЖК увеличивалось: в контрольной группе в 1,4 раза, при приеме МД эфирного масла – в 1,3 раза, в случае БД – в 1,2 раза, то есть прием масла снижал возрастное увеличение доли МНЖК в мозге мышей. Содержание кислот 18:1 ω 7 и 18:1 ω 9 в процессе старения мышей увеличивалось в 1,2 раза в контрольной группе, но прием эфирного масла в обеих дозах в течение 24 месяцев приводил к снижению доли этих кислот до уровня, наблюдавшегося у 2-месячных мышей. Содержание эйкозаеновых кислот 20:1 ω 7 и 20:1 ω 9 в процессе старения увеличивалось в 1,7 раза в контрольной группе, в 2 раза при приеме МД и в 1,2 раза при действии БД масла. Еще большее влияние оказывало эфирное масло на содержание кислот 24:1 ω 7 и 24:1 ω 9: в группе животных, не получавших эфирное масло, доля этих кислот в процессе старения увеличивалась в 2,5 раза, а при приеме обеих доз масла – почти в 3 раза.

Старение приводило к снижению доли ПНЖК в 1,1 раза в мозге мышей в возрасте 25 месяцев (Таблица 3.4). Постоянный прием в течение всей жизни эфирного масла в обеих дозах, наоборот, увеличивал содержание ПНЖК в мозге мышей: в 1,2 раза в случае МД и в 1,14 раза при приеме БД по сравнению с молодыми 2-месячными животными. При этом увеличивался уровень таких ПНЖК, как 18:2 ω 6 (при действии БД масла), 20:2 ω 6, 20:3 ω 6 и 20:4 ω 6 (при

приеме МД масла), а также важнейшей для работы мозга кислоты 22:6 ω 3 в случае приема обеих доз эфирного масла. ПНЖК являются основными составляющими фосфолипидов, которые формируют биологические мембраны клеток мозга. Сохранение уровня ПНЖК крайне важно для поддержания функциональности мозга и всей нервной системы, так как эти кислоты участвуют в электрофизиологических функциях, в функциях обучения, памяти, поведения. Так, арахидоновая кислота регулирует активность эндогенных фосфолипаз, присутствующих в фосфолипидах мембран. Арахидоновая и докозагексаеновая кислоты активируют транскрипцию генов, отвечающих за липид-связанные белки, которые ответственны за сигнальные пути. Это крайне важно для правильного развития детей, в частности, для их неврологических и сенсорных функций, особенно зрения. Высокий уровень содержания докозагексаеновой кислоты 22:6 ω 3 усиливает транспорт холина в зрительные клетки, влияет на электрические сигналы, рост нейронов, на синаптические процессы, гармонизирует церебральное развитие. [239].

Таким образом, систематический прием эфирного масла значительно улучшал жирнокислотный состав мозга стареющих мышей, уменьшая количество насыщенных ЖК и обогащая его полезными полиненасыщенными ЖК, уровень которых в процессе старения снижался.

3.2. Влияние эфирного масла орегано на прививаемость и развитие карциномы Льюис, на параметры ПОЛ в эритроцитах, печени и мозге мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black

Актуальной задачей современной биохимии является поиск веществ, защищающих живые организмы от неблагоприятного действия окружающей среды, в том числе от канцерогенных факторов. Мы изучили *in vivo* влияние эфирного масла орегано (*Origanum vulgare L.*), принимаемого мышами-гибридами линии F1 DBA ×C57 Black в малых дозах с питьевой водой в течение 3 месяцев, на устойчивость мышей к прививаемой опухоли карциномы Льюис и на некоторые показатели окислительного стресса у этих животных [241].

У молодых интактных мышей в возрасте 2 месяцев были определены физико-химические показатели в крови, печени и мозге. Оставшиеся мыши были разделены случайным образом на 2 группы. Опытная группа получала ЭМ орегано с питьевой водой (концентрация масла в воде 0,15 мкг/мл), контрольная группа содержалась на обычной питьевой воде. Через 3 месяца эксперимента у мышей в возрасте 5 месяцев были вновь определены физико-химических характеристики крови и органов. Оставшимся животным контрольной и опытной групп перевивали опухоль путем внутримышечного введения суспензии опухолевых клеток карциномы Льюис в двух концентрациях: 5×10^4 или 5×10^5 кл. в 1 мл инокулята. Полученные таким образом 4 группы животных наблюдались в течение 1 месяца, у них определяли степень прививаемости опухоли, ее размер и продолжительность жизни животных.

Перевивание опухолевых клеток карциномы Льюис лабораторным животным является удобной экспериментальной моделью для изучения противоракового действия препаратов. При этом определяется влияние препарата на устойчивость организма к введению раковых клеток и его сопротивляемость к развитию опухолевого процесса. Контролируемыми параметрами являются степень прививаемости опухоли, кинетика ее роста и продолжительность жизни животных. Полученные данные были использованы для построения графиков роста опухоли с увеличением времени. Эти графики были аппроксимированы уравнением линейной регрессии 2.1.

$$y = B + Ax, \text{ где} \quad (2.1)$$

y – средний размер опухоли,

A и B – коэффициенты линейной регрессии,

x – время.

Обнаружено, что даже 3- месячный прием ЭМ орегано в малых дозах оказывал значительное противораковое действие в изученной модели перевиваемой карциномы Льюис. Из Таблицы 3.5 видно, что при концентрации клеток в инокуляте 5×10^4 скорость роста опухоли, которую оценивали по изменению параметра А, в опыте была ниже, чем в контроле на 28%. В случае большей концентрации клеток в инокуляте 5×10^5 также наблюдали снижение скорости гибели на 12% по сравнению с контролем.

Таблица 3.5.

Влияние эфирного масла орегано на степень прививаемости карциномы Льюис, максимальный размер и скорость роста опухоли у мышей-гибридов DBA \times C 57 Black

Концентрация клеток карциномы Льюис, кл./мл		Степень прививаемости, %	Максимальный размер опухоли, мм ³	Скорость роста опухоли (коэффициент А)
5×10^5	Контроль (вода)	100	7800 ± 200	$283,5 \pm 25,9$
	Опыт	100	7100 ± 200	$249,9 \pm 21,7$
5×10^4	Контроль (вода)	52	6000 ± 200	$229,1 \pm 8,8$
	Опыт	29	4100 ± 200	$166,2 \pm 18,0$

Как видно из Рисунка 3.10 в опыте с большей концентрацией клеток в инокуляте (5×10^5 кл./мл) все животные погибли за 32-34 дня после перевивания опухоли. Степень прививаемости карциномы Льюис была одинаковой в обеих группах, но в опытной группе максимальный размер опухоли был на 10% меньше по сравнению с контролем (Таблица 3.5). В группах мышей, которым перевивали опухолевые клетки в концентрации 5×10^4 кл./мл, различия оказались более значимыми: мыши жили с опухолью около 45 дней, степень прививаемости опухоли в контрольной группе составила 52%, а в опытной она была меньше в 1,8 раза и составила только 29% (Таблица 3.5). Кроме того, при этой концентрации клеток опухоль монотонно увеличивалась в размере до 50 дня в контрольной группе мышей, но в опытной группе она достигала максимального размера к 30 дней и более не увеличивалась вплоть до 60 дней (Рисунок 3.10). В среднем ее максимальный размер был на 30% меньше у мышей опытной группы по сравнению с контролем (Таблица 3.5).

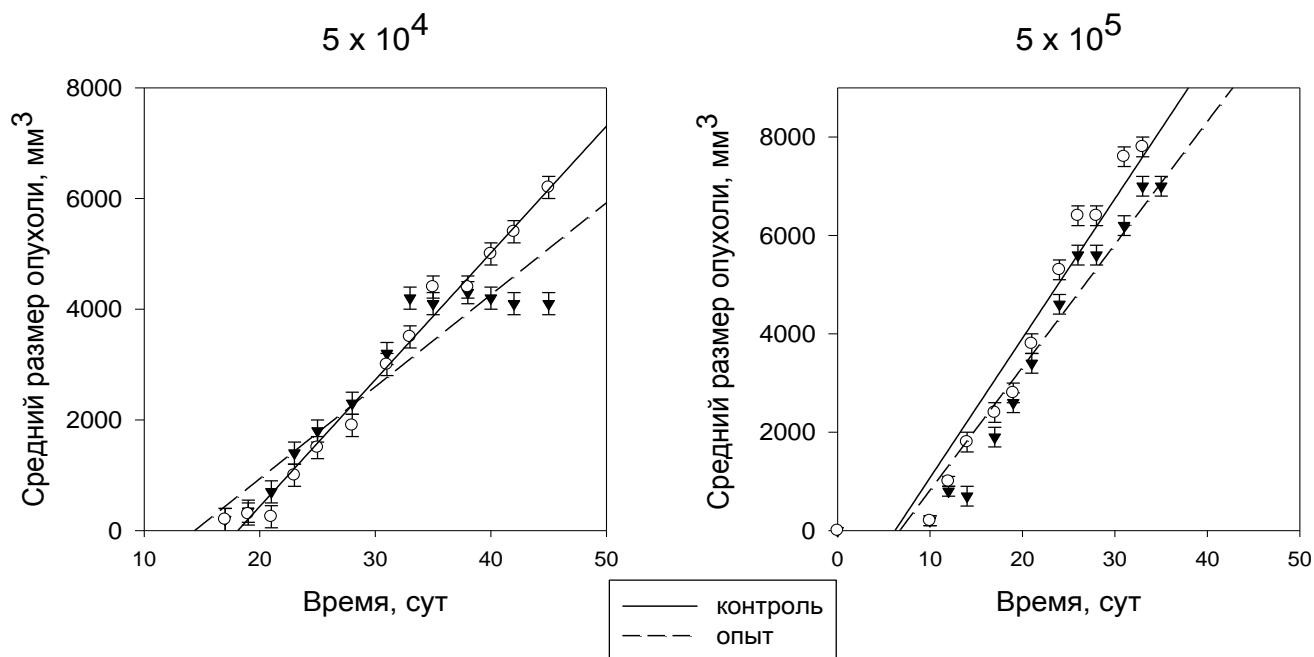


Рисунок 3.10. Кривые роста опухоли карцинома Льюис у мышей-гибридов DBA × C 57 Black в контроле и при употреблении ЭМ орегано (опыт). Концентрация клеток в инокуляте: слева – 5×10^4 , справа – 5×10^5 . Данные аппроксимированы уравнениями линейной регрессии: $y(5 \times 10^4_{\text{контроль}}) = 229,1x - 4145$, $y(5 \times 10^4_{\text{опыт}}) = 166,2x - 2388$, $y(5 \times 10^5_{\text{контроль}}) = 283,5x - 176$, $y(5 \times 10^5_{\text{опыт}}) = 249,9x - 1682$, ($p < 0,0001$).

Эти данные с высокой достоверностью свидетельствуют о том, что даже краткосрочный прием мышами малых доз ЭМ орегано увеличивал сопротивляемость организма введению опухолевых клеток, снижал степень заболеваемости и размеры опухоли у заболевших животных, то есть эфирное масло проявляло профилактическое действие. Следует отметить, что подобная активность ЭМ орегано обнаружена впервые. Ранее сообщалось о способности ЭМ орегано модулировать экспрессию ряда противовоспалительных цитокинов, в частности ФНО- α – одного из ключевых компонентов цитокиновой сети, обладающего выраженной противоопухолевой активностью [242]. Возможно, и в нашем случае, масло орегано влияло на развитие и течение опухолевого процесса также через активацию регуляторных молекул клеток.

Нами исследованы изменения физико-химических показателей органов и тканей мышей-гибридов в опытной группе, употреблявшей ЭМ орегано в течение 3 месяца, и в контрольной группе, в которой мыши получали чистую питьевую воду, по сравнению с этими параметрами у интактных животных в возрасте 2-х месяцев.

Степень гемолиза эритроцитов является характеристикой устойчивости клеточных мембран к механическому разрушению. Одной из причин снижения их прочности может быть интенсификация процессов перекисного окисления липидов. Из данных, представленных на Рисунке 3.11, видно, что степень гемолиза эритроцитов достоверно снижалась на 20% у мышей в возрасте 5 месяцев по сравнению с 2-месячными животными. Прием эфирного масла орегано в этот период в дозе 0,15 мкг/мл питьевой воды практически не изменял степень гемолиза, то есть не влиял на устойчивость мембран эритроцитов.

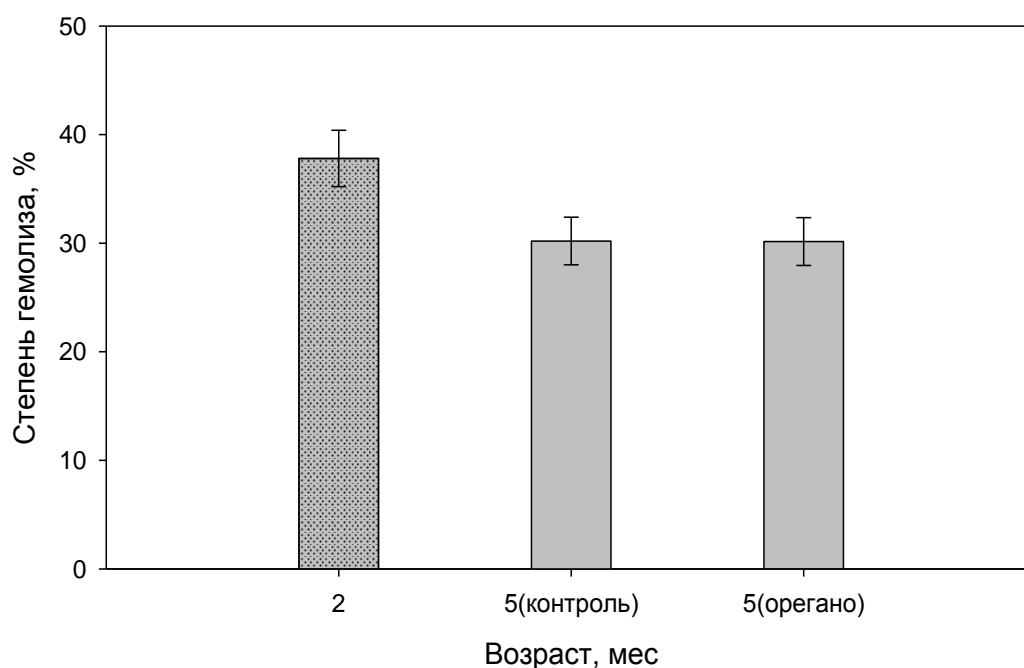


Рисунок 3.11. Степень гемолиза эритроцитов у мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black при приеме ЭМ орегано

На Рисунке 3.12 приведены данные об изменении содержания продуктов ПОЛ в эритроцитах мышей-гибридов при приеме ЭМ орегано. Видно, что с увеличением возраста мышей от 2 до 5 месяцев содержание ТБК-АП существенно (~ в 2 раза) снижалось в опытной и в контрольной группах.

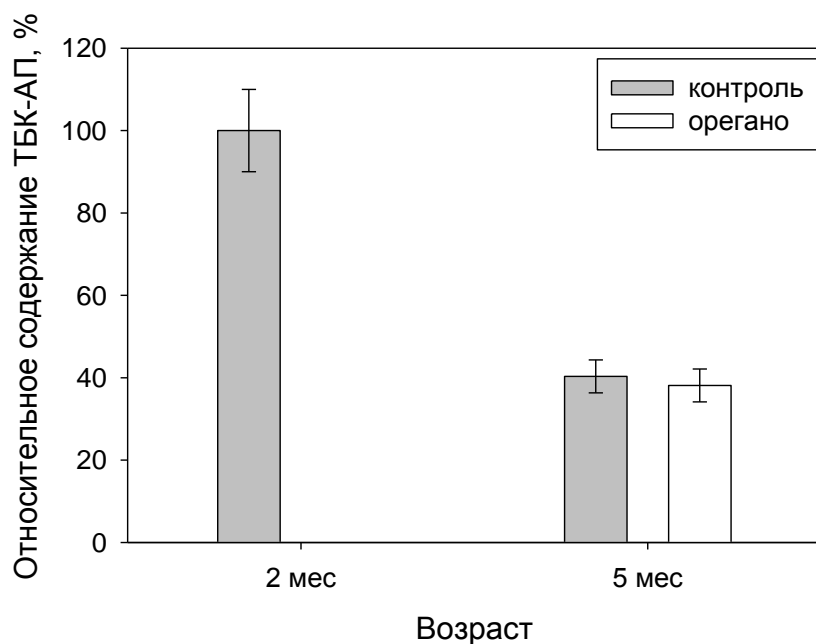


Рисунок 3.12. Относительное содержание ТБК-АП в эритроцитах мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black при приеме ЭМ орегано

Увеличение возраста животных от 2 до 5 месяцев сопровождается снижением интенсивности процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов, а также снижением величин степени гемолиза. Таким образом, снижение степени окисления липидов мембран эритроцитов хорошо коррелирует с устойчивостью мембран к механическому гемолизу. Прием ЭМ орегано в течение 3 месяцев незначительно увеличивал устойчивость липидов эритроцитов мышей к окислению. Вероятно, на этом этапе жизни мышей в клетках присутствует достаточное количество эндогенных ферментов-антиоксидантов с высокой активностью, которые поддерживают антиоксидантный статус организма на стабильном высоком уровне.

Нами был изучен ЖК состав мембран эритроцитов мышей-гибридов при приеме ЭМ орегано, результаты приведены в Таблице 3.6. Видно, что суммарное содержание насыщенных ЖК у 5-месячных животных контрольной группы было выше в 1,2 раза по сравнению с более молодыми животными. В случае приема ЭМ у опытных мышей в возрасте 5 месяцев содержание насыщенных ЖК практически не изменялось.

Суммарное содержание мононенасыщенных ЖК (МНЖК) изменялось незначительно с увеличением возраста животных от 2 до 5 месяцев, а при приеме ЭМ орегано возрастало в 1,1 раза по сравнению с животными других групп.

С увеличением возраста животных наблюдалось снижение содержания полиненасыщенных ЖК: у 5-месячных контрольных животных оно оказалось в 1,2 раза ниже, чем у 2-месячных, однако у мышей, употреблявших добавки масла, содержание ПНЖК было ниже только на 10%.

Таблица 3.6.

Состав жирных кислот в эритроцитах мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black в разном возрасте и при приеме ЭМ орегано

Кислота	Содержание ЖК, % отн.		
	2 мес, контроль	5 мес, контроль	5 мес, опыт
16:0	30,00 ± 0,90	32,05 ± 0,96	28,97 ± 0,87
17:0	0,37 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,55 ± 0,01
18:0	13,15 ± 0,39	16,59 ± 0,50	15,31 ± 0,46
20:0	0,37 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,28 ± 0,01
22:0	0,92 ± 0,02	1,46 ± 0,04	0,69 ± 0,02
24:0	1,11 ± 0,03	1,95 ± 0,06	0,55 ± 0,02
∑ НЖК	45,92	53,52	46,35
16:1ω7, 16:1ω9	1,29 ± 0,04	1,95 ± 0,06	1,37 ± 0,04
18:1ω9	17,22 ± 0,52	16,5 ± 0,50	19,21 ± 0,58
18:1ω7	2,04 ± 0,06	1,46 ± 0,04	3,17 ± 0,10
20:1ω9	0,37 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,28 ± 0,01
24:1ω9, 24:1ω7	0,74 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,28 ± 0,01
∑ МНЖК	21,66	21,37	24,31
18:2ω6	15,18 ± 1,46	8,78 ± 0,26	10,48 ± 0,31
20:3ω6, 20:3ω9	0,74 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,41 ± 0,01
20:4ω6	11,85 ± 0,36	11,71 ± 0,35	13,79 ± 0,41
22:4ω6	1,11 ± 0,03	0,98 ± 0,02	0,83 ± 0,02
22:6ω3	3,33 ± 0,10	2,95 ± 0,09	3,83 ± 0,11
∑ ПНЖК	32,21	24,92	29,34
Суммарное содержание МНЖК+ПНЖК, %	53,87	46,29	53,65

Итак, с увеличением возраста наблюдалось изменение баланса ЖК в эритроцитах: увеличивалось содержание насыщенных ЖК и снижалось общее содержание ненасыщенных

(МНЖК+ПНЖК). Прием эфирного масла орегано в течение 3-х месяцев способствовал поддержанию баланса ЖК в эритроцитах на уровне 2-х месячных молодых животных.

Таким образом, проведенные исследования показали, что с увеличением возраста мышей-гибридов от 2 до 5 месяцев в эритроцитах снижалась интенсивность ПОЛ и степень гемолиза эритроцитов. Прием эфирного масла способствовал сохранению баланса насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в эритроцитах мышей на уровне, близком к молодым животным.

Для оценки возможного влияния малых доз ЭМ орегано на антиоксидантный статус печени и мозга мы определили в липидах этих органов величины ТБК-АП у мышей контрольной и опытной групп. Данные представлены на Рисунке 3.13.

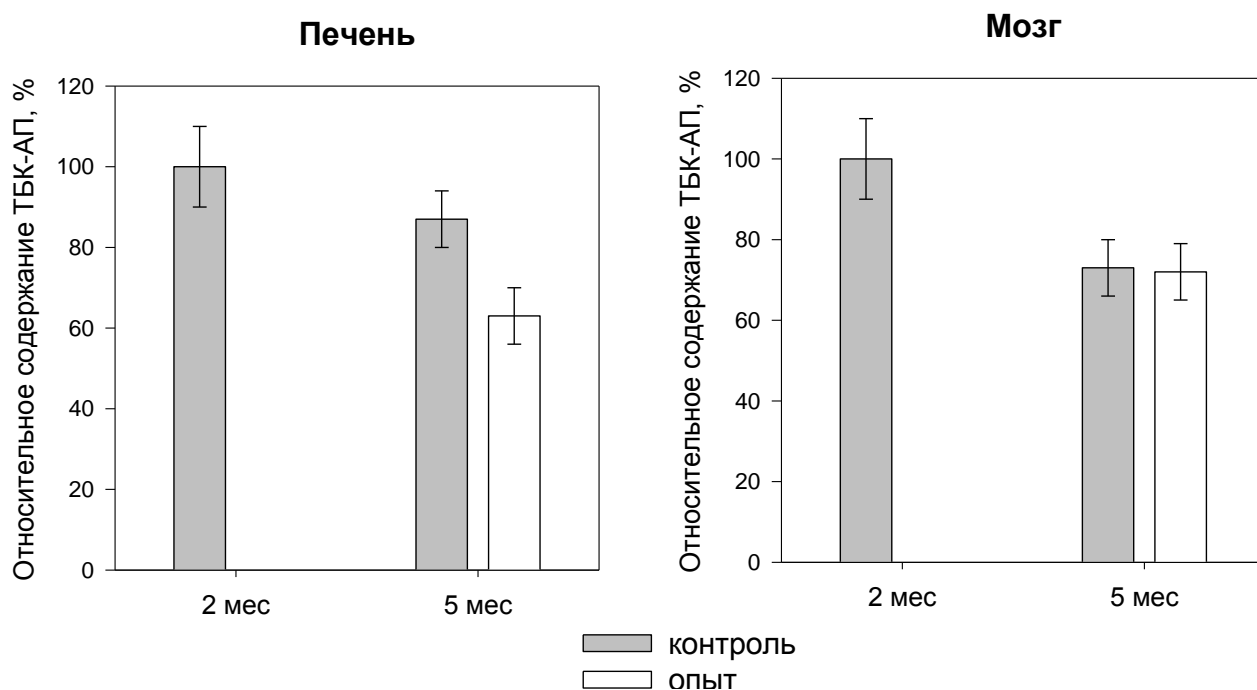


Рисунок 3.13. Относительное содержание ТБК-АП в липидах печени и мозга мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black при приеме ЭМ орегано (опыт)

Можно видеть, что с увеличением возраста от 2 до 5 месяцев интенсивность ПОЛ в мозге мышей снижалась на 27%, в печени – на 13%. Прием эфирного масла не влиял на интенсивность ПОЛ в мозге мышей – величины ТБК-АП в контрольной и опытной группе были одинаковы, но приводил к значительному (на 36%) снижению содержания ТБК-АП в липидах печени 5-месячных мышей по сравнению с 2-месячными контрольными животными.

Одной из причин такого снижения процессов ПОЛ в печени может быть увеличение активности антиоксидантных ферментов в печени мышей, принимавших ЭМ орегано. Известно, что в формировании противоопухолевой активности принимает участие ферментная система организма, чувствительность которой к разного рода воздействиям зависит от локализации ферментов [243]. В нашей работе были измерены активности ферментов (Cu, Zn-СОД, Mn-СОД, ГП и ГТ) в двух фракциях клеток печени - в цитозольной и митохондриальной. Полученные результаты представлены в Таблице 3.7.

Изученные ферменты участвуют в детоксикации супероксидных радикалов (СОД), пероксида водорода и органических пероксидов (ГП), а также различных ксенобиотиков (ГТ). Как видно из Таблицы 3.7, через 3 месяца приема масла активности всех ферментов в печени мышей, кроме Cu,Zn-СОД, заметно повышены: активность Mn-СОД митохондрий увеличилась в 1,5 раза, ГП цитозоля и митохондрий – в 1,2 раза, ГТ цитозоля – в 3 раза и ГТ митохондрий – в 2 раза.

Таблица 3.7.

Активность антиоксидантных ферментов в цитозоле и митохондриях печени мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black в возрасте 5 месяцев при приеме ЭМ орегано

Фермент	Отношение активности, опыт/контроль	
	цитозоль	митохондрии
СОД	1,01	1,50
ГП	1,26	1,18
ГТ	2,67	1,82

Ранее было обнаружено, что способность некоторых природных соединений, в том числе эфирных масел, индуцировать детоксицирующие ферменты, например ГТ [244], может коррелировать с их противораковой активностью. Полученные данные свидетельствуют о том, что прием малых доз ЭМ орегано увеличивал АО статус печени, снижал в ней уровень ПОЛ. Обменные процессы в печени идут намного быстрее, чем в мозге, и компоненты эфирного масла, такие как карвакрол и тимол, попадая в печень, влияют на активность антиоксидантных ферментов и сами могут участвовать в обменных процессах, проявляя при этом *in vivo* свойства биоантиоксидантов.

В Таблице 3.8 приведены результаты хроматографического анализа состава ЖК печени мышей-гибридов контрольной и опытной групп, принимавших ЭМ в течение 3 месяцев.

Таблица 3.8.

Состав жирных кислот в печени мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black в разном возрасте и при приеме ЭМ орегано (опыт)

Кислота	Содержание ЖК, % отн.		
	2 мес, контроль	5 мес, контроль	5 мес, опыт
16:0	25,50 ± 0,77	25,45 ± 0,76	25,27 ± 0,76
17:0	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01
18:0	10,15 ± 0,30	12,03 ± 0,36	13,87 ± 0,40
20:0	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,11 ± 0,00
22:0	0,16 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,26 ± 0,01
23:0	0,08 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,11 ± 0,00
24:0	0,13 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,01
∑ НЖК	36,40	38,38	40,08
16:1ω9	0,43 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,23 ± 0,01
16:1ω7	2,13 ± 0,06	1,88 ± 0,06	1,49 ± 0,05
18:1ω9	23,27 ± 0,70	20,23 ± 1,23	15,48 ± 1,02
18:1ω7	1,91 ± 0,06	2,21 ± 0,07	2,35 ± 0,07
20:1ω9	0,43 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,32 ± 0,01
20:1ω7	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
24:1ω7	0,30 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,37 ± 0,01
∑ МНЖК	28,50	25,31	20,27
18:2ω6	19,03 ± 0,57	16,51 ± 0,50	15,5 ± 0,47
20:2ω6	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,01
18:3ω6	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,01
20:3ω6	0,76 ± 0,02	0,77 ± 0,02	1,03 ± 0,03
20:4ω6	8,37 ± 0,25	11,01 ± 0,33	13,44 ± 0,40
22:4ω6	0,38 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,60 ± 0,01
22:5ω6	0,22 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,52 ± 0,01
22:5ω3	0,32 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,54 ± 0,01
22:6ω3	5,48 ± 0,16	5,93 ± 0,18	7,41 ± 0,22
∑ ПНЖК	35,10	36,29	39,53
Суммарное содержание МНЖК+ПНЖК, %	63,60	61,60	59,80

Можно видеть, что содержание насыщенных ЖК повышалось незначительно с увеличением возраста в обеих группах мышей 5-месячного возраста по сравнению с животными в возрасте 2 месяцев. Это означает, что 3-месячный прием ЭМ практически не оказывал влияния на содержание НЖК. Суммарное содержание МНЖК падало с увеличением возраста на 3% у 5-месячных мышей контрольной группы по сравнению с 2-месячными животными. В случае употребления мышами ЭМ этот показатель снижался еще больше: у опытной группы мышей в возрасте 5 месяцев содержание МНЖК было меньше на 8%, чем у животных того же возраста в контрольной группе.

Содержание ПНЖК в печени мышей-гибридов практически не изменялось с увеличением возраста. Однако при употреблении ЭМ орегано наблюдалось увеличение содержания ПНЖК на 4% у 5-месячных мышей по сравнению с контрольными животными того же возраста. Общее содержание ненасыщенных ЖК (МНЖК+ПНЖК) в печени мышей снижалось незначительно у контрольных животных в возрасте 5 месяцев по сравнению с 2-месячными. При приеме орегано значение этого показателя у мышей в возрасте 5 месяцев уменьшалось на 4% по сравнению с контролем того же возраста. Таким образом, обнаружено, что состав ЖК в печени мышей-гибридов мало изменялся с увеличением возраста мышей. Прием ЭМ орегано также слабо влиял на состав ЖК в печени мышей, отмечено незначительное изменение в соотношении моно- и полиненасыщенных ЖК: уровень МНЖК снижался, а содержание ПНЖК возрастало.

Данные о ЖК составе мозга мышей, употреблявших в течение 3 месяцев ЭМ орегано, приведены в Таблице 3.9. Видно, что суммарное содержание НЖК в мозге практически не изменялось с увеличением возраста и при приеме масла. Содержание МНЖК в мозге снижалось с увеличением возраста на 8% и мало зависело от приема ЭМ орегано. Содержание ПНЖК у 5-месячных мышей оказалось выше на 9% по сравнению с более молодыми животными, а при приеме ЭМ орегано наблюдали снижение ПНЖК на 3% по сравнению с контролем того же возраста. В целом, суммарное содержание ненасыщенных ЖК (МНЖК+ПНЖК) в мозге мышей изменялось незначительно как с увеличением возраста, так и при приеме масла.

Таблица 3.9.

Состав жирных кислот в мозге мышей-гибридов F1 DBA×C57 Black с увеличением возраста и при приеме эфирного масла орегано (опыт)

Кислота	Содержание ЖК, % отн.		
	2 мес, контроль	5 мес, контроль	5 мес, опыт
16:0	18,83 ± 0,56	19,64 ± 0,59	21,48 ± 0,65
17:0	0,15 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,13 ± 0,00
18:0	20,84 ± 0,63	22,11 ± 0,66	21,77 ± 0,65
20:0	0,60 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,32 ± 0,03
22:0	0,83 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,01
23:0	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,19 ± 0,01
24:0	1,39 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,61 ± 0,02
∑ НЖК	42,89	43,30	44,87
16:1ω9	0,41 ± 0,01	0,69 ± 0,02	0,48 ± 0,01
18:1ω9	18,17 ± 0,55	13,95 ± 0,42	14,9 ± 0,45
18:1ω7	4,02 ± 0,12	3,50 ± 0,10	3,66 ± 0,11
20:1ω9	3,17 ± 0,10	1,22 ± 0,04	1,50 ± 0,05
20:1ω7	0,58 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,01
22:1ω9	0,27 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,13 ± 0,00
22:1ω7	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,00
24:1ω7	3,71 ± 0,11	1,91 ± 0,06	1,98 ± 0,06
∑ МНЖК	30,52	21,78	23,08
18:2ω6,	0,60 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,59 ± 0,01
20:2ω9	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,05 ± 0,00
20:2ω6	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00
20:3ω6,	0,35 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,24 ± 0,01
20:4ω6	8,64 ± 0,26	11,06 ± 0,33	10,19 ± 0,31
22:4ω6	2,75 ± 0,08	4,47 ± 0,04	2,67 ± 0,08
22:5ω6	0,13 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,24 ± 0,01
22:6ω3	13,80 ± 0,41	18,00 ± 0,54	17,97 ± 0,54
∑ ПНЖК	26,56	34,91	32,03
Суммарное содержание МНЖК+ПНЖК, %	57,08	56,70	55,13

Таким образом, проведенное исследование позволило установить наличие противораковой активности у ЭМ орегано. Даже кратковременное 3-месячное употребление малых доз этого масла в качестве добавки в питьевую воду увеличивало устойчивость здоровых животных к введению раковых клеток и существенно ингибировало развитие опухоли у заболевших мышей: снижалась степень прививаемости опухоли в 1,8 раза, ее максимальный размер уменьшался на 30%, на 28% снижалась скорость роста опухоли. Установлено, что с увеличением возраста мышей-гибридов от 3 до 5 месяцев увеличивалась механическая резистентность мембран эритроцитов. В опытной группе мышей, принимавших ЭМ орегано, отмечено увеличение активности антиоксидантных ферментов печени мышей, снижение интенсивности ПОЛ в печени и эритроцитах мышей, увеличение антиоксидантного статуса организма, что характеризует ЭМ орегано как природный биоантиоксидант. Совокупность различных видов биологической активности у ЭМ орегано, включая его свойства биоантиоксиданта, способствуют увеличению сопротивляемости организма мышей вредным факторам окружающей среды, в том числе введению в их организм раковых клеток.

3.3. Влияние эфирного масла чабера на продолжительность жизни и биохимические характеристики органов и тканей мышей линии АКР со спонтанным лейкозом

3.3.1. Влияние эфирного масла чабера на продолжительность жизни мышей и развитие спонтанного лейкоза

В данной главе приведены результаты проведенного нами исследования биологической активности эфирного масла чабера садового (*Satureja hortensis* L.) в опытах *in vivo*. Эфирное масло вводили мышам с питьевой водой на протяжении всей жизни. В работе оценивали влияние масла чабера на продолжительность жизни мышей высокоракетной линии АКР и на показатели окислительного стресса в эритроцитах, печени и мозге этих животных [245]. Известно, что у мышей линии АКР в возрасте 6-11 месяцев в 65–90% случаев возникает спонтанный лейкоз [246]. Следует отметить, что именно спонтанные лейкозы мышей по происхождению и клиническим проявлениям, по сходству патологических и морфологических особенностей течения являются наиболее близкими к лейкозам человека. Подробное исследование кинетики развития этого процесса проведено в работе [247].

Эфирное масло чабера, использованное нами в работе, относится к карвакролсодержащим. Кроме карвакрола (37,8%) и тимола (18,1%) оно содержит по 0,5- 1,7% монотерпеновых углеводородов (α -туйен, α -пинен, камфен, β -пинен, β -мирцен, сабинен, α -фелландрен, α -терпинен), 2,1% р-цимена, 14,8% γ -терпинена, 2,8% борнилацетата и 4,0% β -кариофиллена. Высокое содержание тимола, карвакрола и γ -терпинена отвечает за антиоксидантную активность масла [181, 248]. Из данных, приведенных в разделе 3.1 настоящей работы следует, что длительный прием эфирного масла орегано, содержащего около 70% карвакрола, увеличивал продолжительность жизни интактных мышей линии Balb/c, повышал общий антиоксидантный статус животных, сохранял высоким уровень полиненасыщенных жирных кислот в клетках мозга в процессе старения мышей. Эфирные масла орегано и чабера имеют близкий состав основных компонентов, поэтому можно ожидать, что масло чабера, который, в отличие от орегано, успешно выращивается в средней полосе России, также будет обладать биологической активностью. Следует отметить, что доза масла чабера была точно такой же, как и в опыте с большой дозой эфирного масла орегано – 0,15 мкг/мл питьевой воды. За день животное выпивает около 2 мл указанного раствора, поэтому суточная доза эфирного масла составляла около 0,3 мкг.

На Рисунке 3.14 приведены кривые смертности мышей линии АКР в контроле и при приеме эфирного масла чабера с питьевой водой. Видно, что эфирное масло чабера оказывало заметное противолейкозное действие: кривая смертности мышей опытной группы значительно

сдвинута вправо по сравнению с контролем. Наличие лейкоза определяли по состоянию селезенки и тимуса посмертно для каждой мыши. Установлено, что в опытной группе мышей частота лейкозов составляла 63%, а в контрольной 98%, то есть эфирное масло чабера уменьшало заболеваемость лейкозом на 35%.

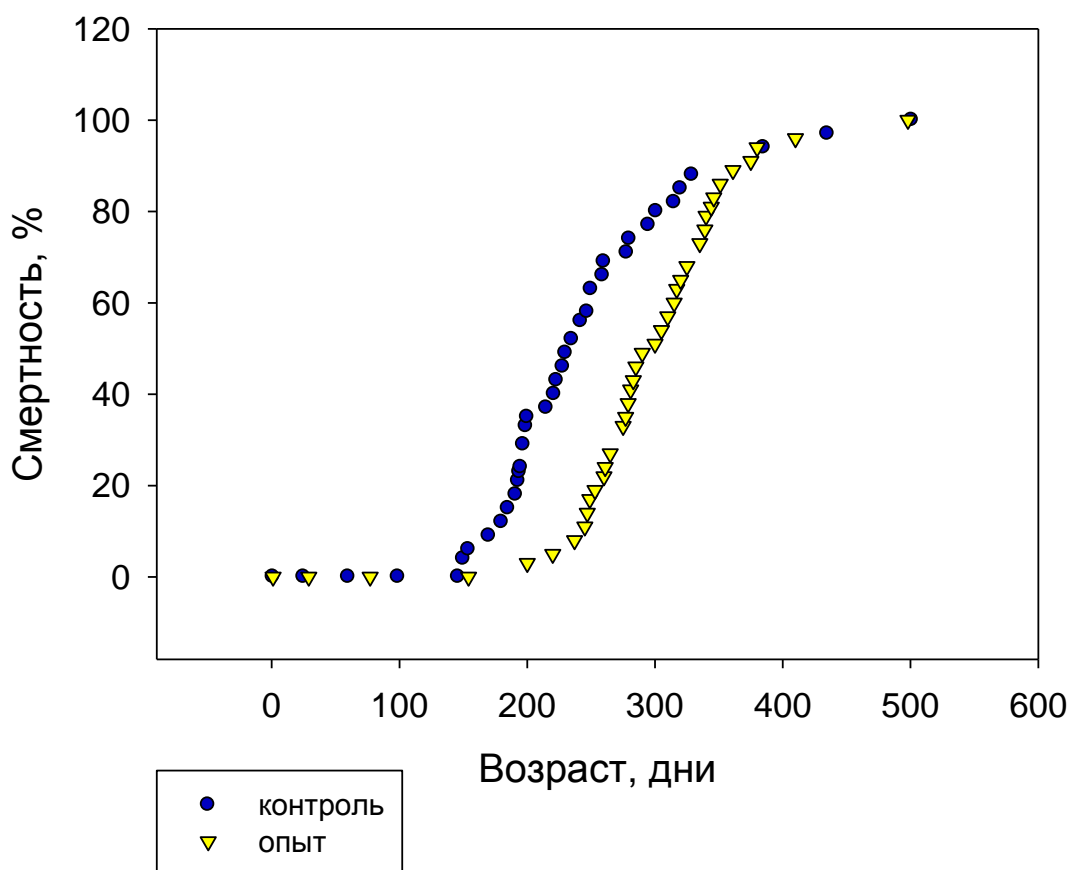


Рисунок 3.14. Кривые смертности мышей АКР в контроле и при добавлении масла чабера в питьевую воду

Сравнение скорости лейкозного процесса в опытной и контрольной группах целесообразно проводить на линейном участке кривой в диапазоне значений от 10 до 90% по оси ординат, где наблюдалась массовая гибель животных. Аппроксимацию этого участка кривой проводили с использованием уравнения линейной регрессии 2.1, где y – смертность, A и B – коэффициенты регрессии, x – время (см. раздел 2.2). Результаты представлены на Рисунке 3.15.

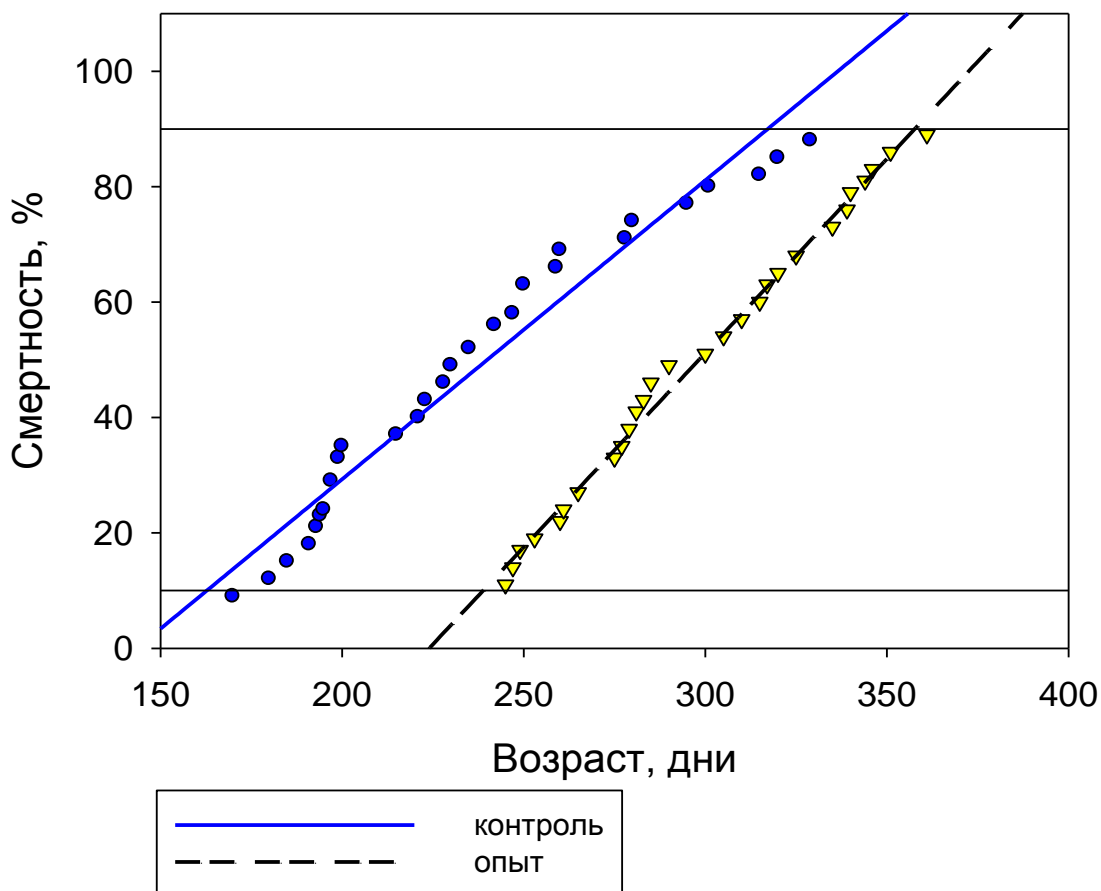


Рисунок 3.15. Участки кривых смертности мышей AKR в контроле и при употреблении эфирного масла чабера. Аппроксимация проведена с использованием уравнений линейной регрессии: $y_{\text{(контроль)}} = 0,52x - 74,3$, $y_{\text{(опыт)}} = 0,67x - 150,8$ ($p < 0,0001$)

Уравнение линейной регрессии аппроксимирует исходные данные на линейном участке кривой с коэффициентом детерминации R^2 равным 0,96-0,99 (Таблица 3.10). Следовательно, уравнение с высокой степенью достоверности может быть применено не только для определения скорости гибели животных, но и для вычисления таких параметров, как время латентного периода лейкоза, средняя и максимальная продолжительность жизни животных. Коэффициент A соответствует средней скорости гибели мышей, которая, как видно из Таблицы 3.10, в опытной группе была выше на 29%, чем в контрольной.

Из уравнения 2.1 можно рассчитать время латентного периода лейкоза мышей, приняв $y=0$. Как видно из Таблицы 3.10, у мышей, употреблявших ЭМ чабера, время латентного периода длится на 82 дня дольше, чем у животных контрольной группы. Принимая $y=50$ и $y=100$ в уравнении 2.1, получаем величины средней и максимальной продолжительности жизни

животных, соответственно. СПЖ мышей в опытной группе была на 26% выше, чем в контрольной, а максимальная продолжительность жизни, рассчитанная из уравнения, была выше по сравнению с контролем на 12% (Таблица 3.10). Можно видеть, что расчеты с использованием регрессионного анализа также свидетельствует о наличии противораковой активности у ЭМ чабера.

Таблица 3.10.

Математическая и статистическая обработка кривых смертности мышей АКР в контроле и при употреблении эфирного масла чабера (опыт)

Параметры	Контроль	Опыт
R^2 (коэффициент детерминации)	0,96	0,99
p (уровень значимости)	<0,0001	<0,0001
Скорость гибели (коэффициент регрессии A)	0,52 ± 0,02	0,67 ± 0,01
Средняя продолжительность жизни, дни	239	300
Максимальная продолжительность жизни, дни	335	374
Латентный период, дни	143	225

Итак, постоянный прием ЭМ чабера способствовал увеличению латентного периода, увеличивал среднюю и максимальную продолжительность жизни мышей, при этом средняя скорость гибели мышей была выше при приеме ЭМ чабера. Ускорение развития опухолевых процессов на более поздних стадиях при употреблении антиоксидантов отмечалось и другими авторами [249]. Динамика развития лейкозного процесса нами не изучалась, поэтому вполне вероятно, что отмена ЭМ чабера на стадии прогрессирования опухолевого роста могла бы способствовать снижению скорости гибели и еще большему увеличению максимального срока жизни мышей АКР в опытной группе. Таким образом, в опытах *in vivo* впервые установлено наличие противоопухолевой активности эфирного масла чабера.

3.3.2. Влияние эфирного масла чабера на физико-химические характеристики эритроцитов

Для исследования антиоксидантного действия эфирного масла чабера у мышей АКР были исследованы степень механического гемолиза эритроцитов и содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ в этих клетках. Биохимический анализ проводили у мышей АКР на протяжении развития лейкозного процесса в возрасте 4, 6, 8 и 10 месяцев в контрольной группе

мышей и в возрасте 4 и 6 месяцев в опытной группе. Лейкозные животные опытной группы начали прием эфирного масла чабера с питьевой водой в возрасте 3 месяцев и принимали его в течение 3 месяцев, так что ко времени проведения биохимических экспериментов их возраст составлял 6 месяцев.

На Рисунке 3.16 представлены данные о степени спонтанного гемолиза в эритроцитах мышей линии AKR в контрольной и в опытной группах. Как видно, с увеличением возраста в контрольной группе мышей AKR степень гемолиза уменьшалась вплоть до 8 месяцев на 20% от исходного уровня, а возрасте 10 месяцев резко увеличилась на 42% по сравнению с 4-х месячными мышами. Такое увеличение степени гемолиза эритроцитов может быть показателем наличия анемии, которая часто сопровождает течение лейкозов. В группе, употреблявшей эфирное масла чабера, через 1 и 3 месяца после приема степень гемолиза была ниже, чем в контрольной группе мышей соответствующего возраста 4 и 6 месяцев на 30 и 25% соответственно.

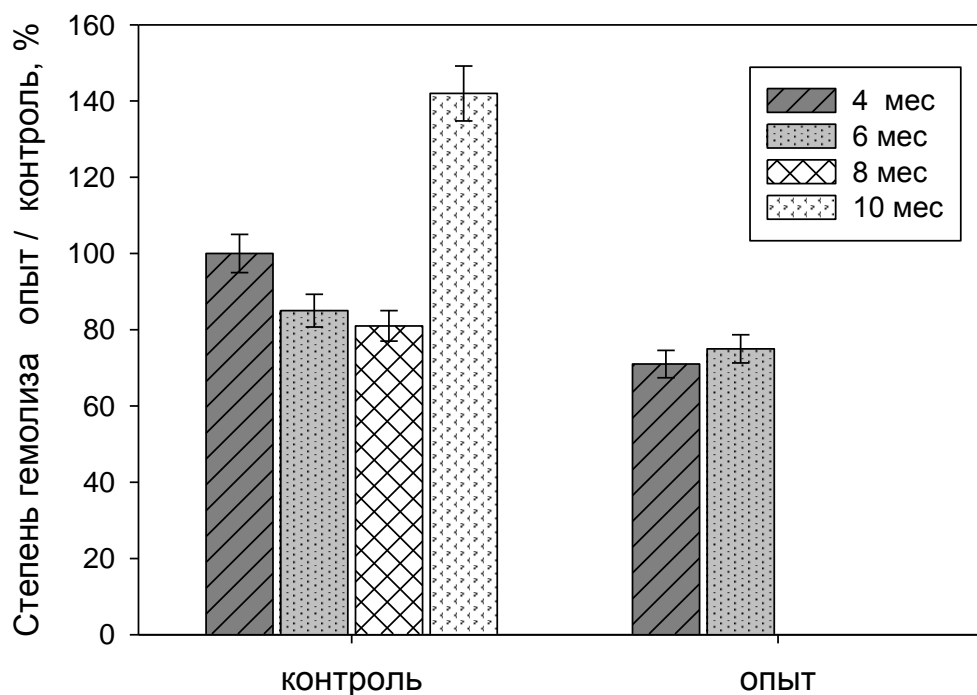


Рисунок 3.16. Степень гемолиза эритроцитов мышей линии AKR с увеличением возраста и при приеме эфирного масла чабера

Такие же закономерности были получены нами на мышах линии Balb/c, а именно, степень гемолиза у животных контрольной группы снижалась с увеличением их возраста вплоть до 25 месяцев, прием эфирного масла орегано еще больше снижал этот параметр у

стареющих мышей (раздел 3.1). Резкое увеличение степени гемолиза у мышей линии АКР в возрасте 10 месяцев объясняется тем, что именно в этом возрасте в изученной группе было установлено активное развитие лейкоза. Возможно, этот факт оказал значительное влияние на все физико-химические показатели эритроцитов.

Таким образом, для двух линий мышей (Balb/c и высоколейкозной АКР) нами было установлено, что снижение степени механического гемолиза эритроцитов является естественной физиологической возрастной закономерностью. Наличие патологического процесса (в данном случае лейкоза) приводит к резкому увеличению этого параметра.

На Рисунке 3.17 приведены данные содержания продуктов ПОЛ в эритроцитах мышей АКР по мере развития лейкозного процесса и при приеме ЭМ чабера. Видно, что концентрация ТБК-АП в эритроцитах мышей линии АКР изменялась незначительно до возраста 8 месяцев, но резко увеличилась в 1,3 раза в 10 месяцев по сравнению с предыдущей точкой (8 месяцев). Прием в течение 3-х месяцев ЭМ чабера приводил к снижению количества продуктов ПОЛ на 10% в эритроцитах 6-месячных мышей по сравнению с контролем того же возраста, т.е. ЭМ проявляло свойства биоантиоксиданта у мышей АКР со спонтанным лейкозом.

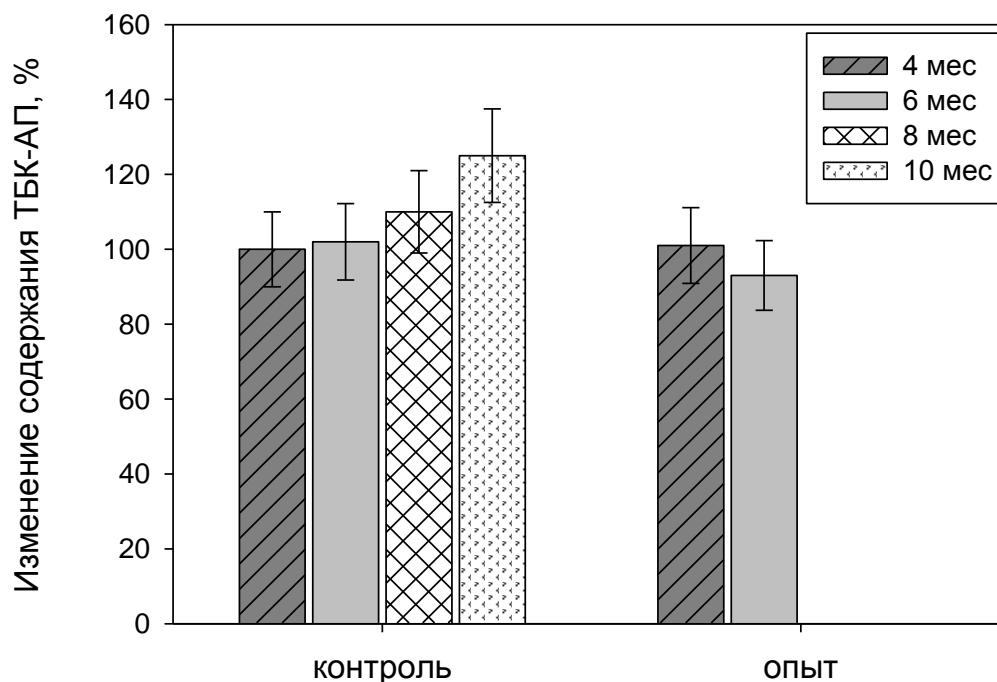


Рисунок 3.17. Содержание ТБК-АП в эритроцитах мышей АКР с увеличением возраста и при приеме эфирного масла чабера

Возникновение и развитие многих патологических состояний, в том числе рост злокачественных новообразований, сопровождается нарушением структуры и свойств биологических мембран. Изменение физико-химического состояния мембран оказывает существенное влияние на процессы мембранного транспорта, системы трансмембранной передачи информации, активность мембранно-связанных ферментов и т.д. Так, показано, что в крови онкологических больных происходят значительные структурно-функциональные изменения эритроцитов: снижение гемолитической стойкости и нарушение сорбционной способности мембран эритроцитов, а также активизация ПОЛ с нарушением липид-белковых взаимодействий [250]. Обнаруженные нами в данной работе эффекты показали, что употребление эфирного масла чабера в процессе развития лейкоза нормализовало состояние эритроцитов – снижалось количество продуктов ПОЛ, уменьшалась степень гемолиза эритроцитов. Действие эфирного масла чабера на мембраны эритроцитов было аналогично влиянию синтетических антиоксидантов, например фенозана: при введении фенозана мышам линии AKR наблюдалось ингибирование процессов ПОЛ в эритроцитах [251].

Таким образом, эксперименты на двух линиях животных – здоровых мышах Balb/c и высоколейкозных мышах AKR показали, что ежедневный прием малых доз эфирных масел орегано или чабера в течение жизни увеличивал продолжительность жизни мышей. Кроме того, прием эфирного масла чабера увеличивал величину латентного периода (срок начала развития лейкоза) у мышей AKR, т.е. оказывал профилактическое действие. По-видимому, такой эффект в значительной мере может быть обусловлен антиоксидантными свойствами этих масел, содержащих природные фенолы – карвакрол и тимол.

3.3.3. Влияние эфирного масла чабера на состав жирных кислот в органах мышей

Нами был изучен состав жирных кислот печени и мозга мышей линии AKR с увеличением их возраста, и проведена оценка влияния эфирного масла чабера, принимаемого мышами с питьевой водой, на жирнокислотный состав этих органов [252, 253]. Биохимический анализ проводили у лейкозных мышей в возрасте 4, 6, 8 и 10 месяцев, у опытных животных (получавших ЭМ чабера) – в возрасте 4 и 6 месяцев. Как уже отмечалось, у мышей линии AKR были найдены признаки слабого лейкозного процесса до возраста 8 месяцев и выраженного лейкоза в возрасте 10 месяцев. Поэтому для 10-месячных мышей, кроме возрастных изменений, вероятно, добавлялись изменения за счет онкологического процесса.

В Таблице 3.11 приведено содержание жирных кислот в печени мышей AKR. Как видно, с возрастом доля насыщенных жирных кислот увеличивалась с 34% до 39%, мононенасыщенных кислот – уменьшалась с 22% до 16%. Суммарное содержание

полиненасыщенных ЖК в печени практически не изменялось с возрастом мышей и при развитии лейкоза. Найденные изменения в составе жирных кислот печени мышей AKR отличаются от возрастных изменений этих показателей для печени здоровых мышей Balb/c, у которых с увеличением возраста незначительно, но монотонно снижалось содержание насыщенных и полиненасыщенных кислот, увеличивалось содержание мононенасыщенных ЖК, которое затем снижалось (раздел 3.1). Для мышей линии AKR найдены более значительные изменения в содержании основных отдельных кислот. Так, содержание ЖК 18:1 ω 9-олеиновой к 10 месяцам монотонно уменьшалось в 1,5 раза, арахидоновой ЖК 20:4 ω 6 увеличивалось в 1,7 раза. Содержание докозагексаеновой кислоты 22:6 ω 3 увеличивалось к 8 месяцам в 1,3 раза, но с развитием лейкоза ее содержание падало до исходного уровня. Таким образом, изменения в содержании основных жирных кислот в печени у разных линий мышей (Balb/c и высокоракковых AKR) с увеличением возраста животных протекают неодинаково.

Прием эфирного масла чабера влиял на состав жирных кислот в печени мышей (Таблица 3.11). Через 1 и 3 месяца употребления эфирного масла доля насыщенных кислот практически не изменялась, мононенасыщенных снижалась и увеличивалась доля полиненасыщенных жирных кислот. Содержание олеиновой кислоты в печени мышей опытных групп было на 30 и 35% меньше, чем в печени контрольных, в то же время содержание арахидоновой и докозагексаеновой кислот было больше, чем в контроле.

Таким образом, прием эфирного масла чабера увеличивал синтез полиненасыщенных ЖК в печени мышей AKR по сравнению с лейкозными мышами того же возраста, но не принимавшими масло, а также снижал синтез мононенасыщенных ЖК. Этот факт отличает мышей линии AKR от мышей линии Balb/c, у которых при старении и употреблении эфирного масла орегано не отмечено значительного влияния этих двух факторов на состав жирных кислот в печени. Возможно, наличие лейкоза у мышей AKR приводит к тому, что их печень в большей степени реагирует на внешние воздействия, чем печень интактных животных. Как известно, и процесс старения, и процесс развития лейкоза сопровождаются интенсификацией окислительных процессов. Возможно, для поддержания баланса жирнокислотного состава и компенсации разрушаемых в ходе окисления в печени мышей AKR полиненасыщенных ЖК происходит увеличение их синтеза. Таким образом, изменение баланса ЖК в печени мышей может быть одним из проявлений адаптивного ответа организма.

Таблица 3.11.

Состав ЖК в печени мышей линии АКР с увеличением возраста и при приеме эфирного масла чабера

Кислота	Группа мышей	Содержание ЖК, % отн.			
		4 мес	6 мес	8 мес	10 мес
16:0	Контроль	22,98±0,67	23,86±0,72	23,85±0,72	24,45±0,74
	Опыт	21,35±0,64	21,16±0,64		
17:0	Контроль	0,25±0,01	0,28±0,01	0,27±0,01	0,42±0,01
	Опыт	0,23±0,01	0,29±0,01		
18:0	Контроль	10,14±0,30	11,69±0,35	11,93±0,36	13,37±0,40
	Опыт	14,01±0,42	14,03±0,42		
20:0	Контроль	0,22±0,01	0,30±0,01	0,35±0,01	0,08±0,00
	Опыт	0,27±0,01	0,41±0,01		
22:0	Контроль	0,24±0,01	0,55±0,01	0,66±0,02	0,37±0,01
	Опыт	0,67±0,02	0,27±0,01		
Σ НЖК	Контроль	33,83	36,68	37,06	38,69
	Опыт	36,53	36,16		
16:1ω9	Контроль	0,40±0,01	0,32±0,01	0,28±0,01	0,08±0,00
	Опыт	0,76±0,02	0,87±0,02		
16:1ω7	Контроль	1,59±0,05	1,56±0,05	1,48±0,04	0,87±0,02
	Опыт	0,76±0,02	0,87±0,02		
18:1ω9	Контроль	16,63±0,50	13,02±0,39	11,87±0,36	11,04±0,33
	Опыт	12,42±0,37	9,16±0,28		
18:1ω7	Контроль	2,67±0,08	2,57±0,08	2,31±0,07	3,08±0,09
	Опыт	1,53±0,05	1,42±0,04		
20:1ω9	Контроль	0,77±0,02	0,56±0,01	0,51±0,01	0,17±0,00
	Опыт	0,81±0,02	0,36±0,01		
24:1ω9	Контроль	0,19±0,01	0,47±0,01	0,48±0,01	0,67±0,02
	Опыт	0,30±0,01	0,27±0,01		

Продолжение Таблицы 3.11

Σ МНЖК	Контроль	22,25	18,5	16,93	15,91
	Опыт	16,58	12,95		
18:2 ω 6,	Контроль	23,11 \pm 0,69	18,57 \pm 0,56	18,88 \pm 0,57	16,78 \pm 0,50
	Опыт	23,02 \pm 0,69	21,54 \pm 0,65		
18:3 ω 6	Контроль	0,26 \pm 0,01	0,18 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00
	Опыт	0,26 \pm 0,01	0,16 \pm 0,00		
20:2 ω 6	Контроль	0,50 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01	0,47 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01
	Опыт	0,76 \pm 0,02	0,44 \pm 0,01		
20:3 ω 6	Контроль	1,20 \pm 0,04	1,36 \pm 0,04	1,47 \pm 0,04	0,46 \pm 0,01
	Опыт	1,29 \pm 0,04	1,48 \pm 0,04		
20:4 ω 6	Контроль	10,24 \pm 0,31	13,46 \pm 0,41	13,05 \pm 0,39	17,70 \pm 0,53
	Опыт	13,44 \pm 0,40	16,12 \pm 0,48		
22:4 ω 6	Контроль	0,56 \pm 0,01	0,64 \pm 0,02	0,66 \pm 0,02	0,58 \pm 0,01
	Опыт	0,74 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01		
22:5 ω 6	Контроль	0,33 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	1,12 \pm 0,03
	Опыт	0,30 \pm 0,01	0,35 \pm 0,04		
22:5 ω 3	Контроль	0,50 \pm 0,01	0,60 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01
	Опыт	0,54 \pm 0,01	0,68 \pm 0,02		
22:6 ω 3	Контроль	7,24 \pm 0,22	8,29 \pm 0,25	9,32 \pm 0,28	7,33 \pm 0,22
	Опыт	6,98 \pm 0,21	9,30 \pm 0,28		
Σ ПНЖК	Контроль	43,94	43,97	44,95	44,88
	Опыт	47,33	50,41		

Относительное содержание метиловых эфиров жирных кислот, выделенных из гомогената мозга мышей в различном возрасте, приведено в Таблице 3.12. Доля насыщенных кислот в клетках мозга мышей в зависимости от возраста варьировалась в пределах 41-45%, мононенасыщенных – 20-25% и полиненасыщенных –30-35%. В группе насыщенных ЖК основными по содержанию были кислоты С16 и С18, их доля составляла от 18% до 22%. Как видно из Таблицы 3.12, суммарное содержание насыщенных кислот уменьшалось до возраста 8 месяцев, затем увеличивалось. В группе мононенасыщенных кислот на долю кислоты 18:1 ω 9 приходилось 13-16%, содержание остальных кислот было менее 4%. С увеличением возраста мышей содержание мононенасыщенных кислот увеличивалось. Так, суммарное содержание этих кислот к 8-месячному возрасту увеличилось в 1,2 раза, но к 10 месяцам уменьшилось.

Основными в группе полиненасыщенных жирных кислот мозга являлись арахидоновая 20:4 ω 6 и докозагексаеновая 22:6 ω 3 кислоты. Содержание первой составляло 9-11%, второй – 16-20%. К возрасту 8 месяцев суммарное содержание ПНЖК в мозге мышей АКР уменьшалось на 12%, но к 10 месяцам увеличивалось и составляло 96% от исходного. Аналогичные изменения с увеличением возраста найдены в содержании арахидоновой и докозагексаеновой кислот (Таблица 3.12). Следует отметить, что суммарное содержание МНЖК и ПНЖК в мозге мышей линии АКР отличались от таковых для мышей линии Balb/c. Так, для мышей линии АКР сумма МНЖК составляла 21-25%, для мышей линии Balb/c эта величина была выше и составляла 23-32%. Сумма ПНЖК в мозге мышей АКР составляла 30-35%, тогда как для мышей линии Balb/c она была меньше и составляла 26-30%. При этом суммарное содержание насыщенных кислот в мозге мышей обеих линий было практически одинаковым. Обнаружено сходство в содержании ЖК в мозге мышей обеих линий, но только до возраста 8 месяцев. Различия в составе ЖК в мозге лейкозных мышей в возрасте 10 месяцев можно связать с влиянием патологического процесса. Таким образом, развитие лейкоза у 10-ти месячных мышей сопровождалось увеличением суммарной доли насыщенных и полиненасыщенных кислот и уменьшением мононенасыщенных по сравнению с 8-ми месячными животными. Аналогичные изменения отмечены также для отдельных кислот: 18:1 ω 9, 20:4 ω 6 и 22:6 ω 3.

В Таблице 3.12 также приведен состав жирных кислот мозга мышей, употреблявших эфирное масло чабера в течение 1 и 3 месяцев (возраст мышей составлял 4 и 6 месяцев соответственно). Как видно, прием эфирного масла чабера в течение 1 месяца сопровождался снижением уровня насыщенных жирных кислот и увеличением содержания мононенасыщенных жирных кислот в мозге мышей по сравнению с контрольной группой. Также за это же время увеличивалось содержание олеиновой кислоты и снижалось содержание арахидоновой. Прием эфирного масла в течение 3 месяцев снижал уровень насыщенных жирных кислот и увеличивал суммарное содержание мононенасыщенных. Употребление эфирного масла чабера в течение 1 или 3 месяцев практически не оказывало влияния на суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот, а также на содержание докозагексаеновой кислоты.

Несмотря на то, что значительные колебания в жирнокислотном составе могут прямо или косвенно влиять на функционирование клеточных мембран мозга, мы считаем, что установленный уровень соотношения этих трех групп кислот находился в рамках физиологической нормы. Для мышей АКР, по всей видимости, изменения в составе жирных кислот мозга являются отражением трех действующих факторов: увеличение возраста особей, развитие онкологического процесса и прием эфирного масла.

Таблица 3.12.

Состав ЖК мозга мышей линии АКР с увеличением возраста и при приеме эфирного масла чабера

Кислота	Группа мышей	Содержание ЖК, % отн.			
		4 мес	6 мес	8 мес	10 мес
16:0	Контроль	21,39±0,64	18,89±0,56	18,21±0,55	21,61±0,65
	Опыт	15,21±0,46	16,53±0,50		
17:0	Контроль	0,29±0,01	0,15±0,00	0,19±0,01	0,16±0,00
	Опыт	0,29±0,01	0,14±0,00		
18:0	Контроль	21,67±0,65	22,24±0,67	20,00±0,60	20,32±0,61
	Опыт	16,26±0,49	17,07±0,51		
20:0	Контроль	0,34±0,01	0,45±0,01	0,63±0,02	0,26±0,01
	Опыт	0,77±0,02	0,70±0,02		
22:0	Контроль	0,34±0,01	0,50±0,01	0,82±0,02	0,37±0,01
	Опыт	0,87±0,02	0,81±0,02		
23:0	Контроль	0,13±0,00	0,18±0,00	0,35±0,01	0,18±0,00
	Опыт	0,10±0,00	0,20±0,01		
24:0	Контроль	0,58±0,01	0,49±0,01	0,68±0,02	0,60±0,01
	Опыт	0,40±0,01	0,80±0,02		
∑ НЖК	Контроль	44,74	42,9	40,88	43,5
	Опыт	33,9	36,25		
16:1ω9	Контроль	0,48±0,01	0,45±0,01	0,43±0,01	1,02±0,03
	Опыт	0,59±0,01	0,49±0,01		
18:1ω9	Контроль	13,07±0,39	13,40±0,40	16,31±0,49	14,09±0,42
	Опыт	17,89±0,54	18,10±0,54		
18:1ω7	Контроль	3,50±0,11	3,34±0,10	3,74±0,11	3,71±0,11
	Опыт	4,27±0,13	3,82±0,11		
20:1ω9	Контроль	1,14±0,03	1,33±0,04	3,14±0,09	1,24±0,04
	Опыт	3,00±0,09	3,13±0,09		
20:1ω7	Контроль	0,27±0,01	0,28±0,01	0,56±0,01	0,26±0,01
	Опыт	0,25±0,01	0,26±0,01		

Продолжение Таблицы 3.12

22:1ω9	Контроль	0,22±0,01	0,40±0,01	0,54±0,01	0,23±0,01
	Опыт	0,65±0,02	0,50±0,01		
24:1ω9	Контроль	1,71±0,05	2,04±0,06	4,05±0,12	2,18±0,07
	Опыт	4,14±0,12	3,92±0,12		
Σ МНЖК	Контроль	20,39	21,24	28,77	22,73
	Опыт	30,79	36,25		
18:2ω6	Контроль	0,78±0,02	0,75±0,02	0,73±0,02	0,63±0,02
	Опыт	0,79±0,02	2,52±0,07		
20:2ω6	Контроль	0,18±0,00	0,15±0,00	0,21±0,01	0,10±0,00
	Опыт	0,20±0,01	0,26±0,01		
20:3ω6	Контроль	0,40±0,01	0,38±0,01	0,35±0,01	0,26±0,01
	Опыт	0,84±0,02	0,34±0,01		
20:4ω6	Контроль	9,80±0,29	10,66±0,32	9,14±0,27	10,83±0,32
	Опыт	7,73±0,23	8,96±0,27		
22:4ω6	Контроль	3,09±0,09	4,17±0,13	3,63±0,11	3,07±0,09
	Опыт	3,31±0,10	3,55±0,11		
22:6ω3	Контроль	19,99±0,60	19,33±0,58	15,83±0,47	18,77±0,56
	Опыт	19,77±0,59	19,40±0,58		
Σ ПНЖК	Контроль	34,24	35,44	29,89	33,66
	Опыт	32,64	35,03		

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы особое внимание ученые всего мира уделяют поиску новых природных антиоксидантов, которые, в отличие от синтетических, практически не имеют побочных эффектов, при этом они спектр их воздействия на организм чрезвычайно широк. Особый интерес представляет изучение свойств эфирных масел, которые ответственны за фармакологическую активность многих лекарственных растений. Их благотворное действие на организм людей проявляется и при вдыхании воздуха, содержащего малые количества ЭМ. Однако исследований *in vivo* крайне мало, практически не было известно о влиянии долгосрочного приема ЭМ на организм и на продолжительность жизни. Поэтому полученные в работе данные о действии ЭМ на физиологические и биохимические процессы *in vivo* на различных этапах жизни лабораторных животных важны и актуальны.

Проведенное на мышах линии Balb/c исследование эфирного масла орегано выявило важный факт – при его приеме в дозе 0,3 мкг/сут средняя продолжительность жизни животных увеличилась на 120 дней. Вероятно, увеличение СПЖ являлось результатом совокупных физиологических изменений, протекающих в организме мышей при длительном систематическом приеме эфирного масла орегано. Следует отметить, что ежедневное употребление масла в указанной дозе не оказывало токсического действия на животных, что выражалось не только в отсутствии его видимых проявлений, но и в стабильности показателей веса тела и массы тимуса.

Цитогеронтологические исследования, выполненные с использованием культуры трансформированных клеток китайского хомячка, также внесли вклад в понимание биологического действия эфирного масла. Во-первых, эти эксперименты подтвердили безвредность эфирного масла орегано для клеток в дозе менее 10 мкг. Во-вторых, использование в этом исследовании модели «стационарного старения» позволило доказать отсутствие каких-либо механизмов прямого геропротекторного действия масла орегано, реализующихся на клеточном уровне. Скорее всего, обнаруженное увеличение СПЖ мышей при действии эфирного масла связано с его действием на уровне всего организма, поэтому мы в своих исследованиях пристальное внимание уделили изучению тех изменений, которые возможно наблюдать в органах мышей *in vivo*.

Нами были изучены наиболее важные в функциональном отношении физиологические системы организма – кровь (эритроциты), печень и мозг животных. Проведена оценка изменений физико-химических характеристик этих систем с увеличением возраста мышей на протяжении всей жизни, такие данные получены впервые. В опытных группах мышей изучено

влияние приема эфирного масла орегано с питьевой водой в двух дозах – 0,15 мкг/мл и 0,015 нг/мл. Обнаружено, что в эритроцитах с увеличением возраста животных происходило снижение степени гемолиза. По мере взросления мышей от 2 до 9 месяцев содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах снижалось, однако в старости мы наблюдали значительное увеличение количества этих продуктов окисления жирных кислот.

Прием эфирного масла практически не влиял на степень гемолиза эритроцитов у молодых и взрослых животных, однако способствовал еще большему, чем в контроле, снижению этого показателя у старых животных. Ни малая, ни большая доза эфирного масла существенно не изменяли содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах. Возможно, найденное слабое влияние приема эфирного масла на параметры эритроцитов обусловлено тем, что эритроциты – короткоживущие клетки, их состав обновляется примерно каждые три месяца. Слабое влияние масла свидетельствует о том, что оно не изменяло основные биохимические процессы кроветворения в организме мышей в процессе их полного жизненного цикла. Это важное свойство эфирного масла.

В печени интактных мышей с увеличением возраста мы наблюдали незначительные колебания как в содержании индивидуальных ЖК, так и в соотношении классов насыщенных, моновенасыщенных, полиненасыщенных ЖК. При употреблении эфирного масла орегано, как в малой, так и в большой дозах, суммарное содержание каждого класса кислот, так же как и содержание отдельных основных ЖК, изменялось в пределах, установленных для возрастных изменений. Следует лишь отметить незначительное превышение таких пределов в содержании моновенасыщенных и снижении полиненасыщенных жирных кислот в печени мышей в возрасте 25 месяцев по сравнению с контролем того же возраста. По-видимому, отсутствие различий указывает на то, что длительный и регулярный прием орегано не приводил к изменению синтеза и метаболизма жирных кислот в печени мышей.

Было обнаружено, что эфирное масло орегано действовало как биоантиоксидант. Его прием приводил к существенному, на 20-25%, снижению содержания продуктов ПОЛ в печени мышей опытных групп. Более того, прием эфирного масла орегано сопровождался модуляцией ферментативной защитной системы печени мышей. Индукция защитных ферментов, вызываемая действием масла, зависела от локализации фермента, дозы препарата и длительности его употребления. Таким образом, эфирное масло орегано не проявляло токсических эффектов в печени мышей, действовало в этом органе как эффективный биоантиоксидант, увеличивая активность антиоксидантных ферментов и снижая содержание продуктов ПОЛ в этом органе.

Изучены возрастные изменения жирнокислотного состава в мозге интактных мышей. Так, старение животных сопровождалось значительным снижением содержания насыщенных ЖК, в меньшей степени – полиненасыщенных ЖК, и увеличением содержания мононенасыщенных ЖК в мозге мышей. Критически важной для поддержания нормальной работы мозга является докозагексаеновая кислота, ее уровень также снижался у мышей к концу жизни. Употребление эфирного масла орегано способствовало улучшению баланса ЖК в мозге мышей. Важно, что прием орегано сохранял на высоком уровне содержание полиненасыщенных жирных кислот в мозге старых мышей, в том числе и докозагексаеновой ЖК. Можно надеяться, что сохранение высокого уровня полиненасыщенных жирных кислот позволит сохранить и функциональность мозга, которая существенно теряется при старении. Приведенные данные по изменению содержания всех групп жирных кислот в мозге интактных мышей в течение длительного промежутка времени, а именно, от рождения до глубокой старости, а также влияние на эти параметры приема эфирного масла орегано получены впервые.

Таким образом, проведенное исследование показало, что при употреблении эфирного масла орегано в малых дозах не происходило нарушений в функционировании иммунной системы, эритроцитов, печени и мозга. Прием масла положительно влиял на баланс ЖК в мозге мышей и поддерживал высоким содержание докозагексаеновой ЖК, уровень которой снижался у животных к концу жизни. Употребление масла приводило к активации антиоксидантных и защитных ферментов в печени мышей, снижало содержание продуктов ПОЛ. Это позволяет рассматривать эфирное масло орегано как эффективный биоантиоксидант, повышающий устойчивость организма мышей к окислительному стрессу. Более того, масло являлось геропротектором, его употребление в малых дозах увеличивало среднюю продолжительность жизни мышей. Вполне вероятно, что геропротекторное действие масла во многом обусловлено наличием у него комплекса нескольких видов биологической активности – биоантиоксидантной, противовирусной, антибактериальной и противовоспалительной. Наличие совокупности этих видов биологической активности формировало положительное влияние на иммунную систему мышей. Мыши, принимавшие масло, были более устойчивы к вирусам, инфекции, повреждающему действию свободных радикалов и вредным факторам окружающей среды, в результате они меньше болели и дольше жили.

Аналогичное влияние эфирное масло орегано оказало и на органы мышей-гибридов F1 DBAxC57Black. Совокупность полученных данных по изменению биохимических показателей эритроцитов, печени и мозга мышей в процессе их взросления и влияния на эти параметры приема эфирного масла орегано свидетельствует о том, что масло не действовало отрицательно ни на один параметр. Даже кратковременное 3-х месячное употребление малых доз этого масла

в качестве добавки в питьевую воду увеличивало механическую и окислительную резистентность мембран эритроцитов. В опытной группе мышей, принимавших масло, отмечено увеличение активности антиоксидантных ферментов печени мышей, снижение содержания продуктов ПОЛ в печени и эритроцитах мышей, увеличение антиоксидантного и иммунного статуса организма. Более того, наши эксперименты показали, что эфирное масло орегано обладало выраженным противоопухолевым действием. Так, мыши опытной группы, принимавшие эфирное масло орегано, имели повышенную сопротивляемость к вводимой в их организм культуре раковых клеток – карциномы Льюис. Прием эфирного масла мышами-гибридами F1 DBA C57 Black снижал степень прививаемости опухоли в 1,8 раза, уменьшал ее максимальный размер на 30%, увеличивал устойчивость к действию раковых клеток на здоровых животных и существенно ингибировал развитие опухоли у заболевших мышей. Такие данные получены впервые.

Найденные свойства эфирного масла орегано связаны с тем, что его основными компонентами являлись изомерные природные замещенные фенолы – карвакрол и тимол, отвечающие за биологическую активность, в том числе и за антиоксидантные свойства эфирных масел, их содержащих. Близким составом компонентов и биологическими свойствами обладает и эфирное масло чабера. В результате проведенных нами исследований впервые в опытах *in vivo* установлено наличие у эфирного масла чабера противоопухолевой активности. Прием этого масла в малых дозах с питьевой водой снижал частоту лейкозов у мышей линии AKR, увеличивал среднюю продолжительность их жизни на 20%, уменьшал интенсивность окислительного стресса в эритроцитах животных. Найдено, что процесс развития лейкоза сопровождался изменениями в жирнокислотном составе печени мышей AKR: увеличивалась суммарная доля насыщенных и уменьшалась доля мононенасыщенных жирных кислот. Этот факт отличает мышей линии AKR от мышей линии Balb/c, у которых при старении и употреблении эфирного масла орегано состав жирных кислот в печени изменялся незначительно. В ответ на воздействие малых доз эфирного масла чабера в печени лейкозных мышей увеличивался синтез полиненасыщенных ЖК по сравнению с контрольной группой мышей того же возраста. Мы предполагаем, что наличие патологического процесса у мышей AKR приводило к тому, что печень у них в большей степени реагировала на внешние воздействия по сравнению с печенью здоровых мышей Balb/c, это приводило к изменению синтеза и метаболизма жирных кислот в этом органе. Известно, что лейкоз сопровождается усилением ПОЛ, поэтому изменение баланса жирных кислот в печени может быть частью адаптивного ответа организма. Вероятно, биологическое действие эфирных масел со свойствами биоантиоксидантов основано на их способности нейтрализовать свободные

радикалы, а также влиять на пути передачи клеточных сигналов. Известно, что биоантиоксиданты способны нормализовать регуляцию клеточного цикла, предотвратить распространение опухоли и ангиогенез, стимулировать активность ферментов детоксификации ксенобиотиков и, таким образом, препятствовать канцерогенезу. Таким образом, в диссертационной работе впервые получены новые данные о влиянии систематического приема малых доз эфирных масел, обладающих биоантиоксидантными свойствами, на физиологические и биохимические характеристики организма мышей от рождения до старости, в норме и при патологии. Оба изученных эфирных масла являются перспективными натуральными профилактическими геропротекторными и противоопухолевыми средствами и их систематический прием в малых дозах можно рекомендовать для профилактики различных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в экспериментах *in vivo* установлено, что систематический прием эфирного масла орегано в малых дозах на протяжении всей жизни здоровыми мышами линии Balb/c оказывал геропротекторное действие: увеличивалась средняя и максимальная продолжительность жизни, увеличивался латентный период и снижалась скорость гибели животных от старости. Найдено отсутствие токсического действия эфирного масла на организм мышей при длительном и регулярном приеме.
2. Найдено, что эфирное масло орегано в опытах *in vivo* проявляло биоантиоксидантные свойства при его приеме на протяжении всей жизни. Эфирное масло приводило к снижению содержания продуктов ПОЛ и к модуляции активности ферментов антиоксидантной защиты в печени мышей.
3. Обнаружено, что систематический прием малых доз масла орегано на протяжении всей жизни животных стабилизировал состав жирных кислот мозга, сохраняя на высоком уровне долю полиненасыщенных жирных кислот и увеличивая содержание важной для когнитивных функций докозагексаеновой кислоты в мозге стареющих мышей линии Balb/c.
4. Установлено, что эфирное масло орегано обладало противоопухолевой активностью, его прием существенно снижал степень прививаемости и максимальный размер опухоли карцинома Льюис у мышей-гибридов F1 DBA× C57 Black.
5. Выявлено, что эфирное масло чабера, близкое по составу к маслу орегано, обладало противораковым действием в экспериментах на мышах со спонтанным лейкозом линии AKR. Его систематический прием на протяжении всей жизни уменьшал частоту возникновения лейкоза, увеличивал латентный период заболевания и продолжительность жизни мышей AKR. Найдено, что ЭМ чабера обладало свойствами биоантиоксиданта, снижало содержание продуктов ПОЛ в крови и печени мышей AKR.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эмануэль, Н.М. Торможение процессов окисления жиров / Н.М. Эмануэль, Ю.Н. Ляскова. – М: Пищепромиздат, 1961. – 358 с.
2. Бурлакова, Е.Б. Антирадикальная активность и радиозащитные свойства ингибиторов свободнорадикальных реакций / Е.Б. Бурлакова, В.Д. Гаинцева, Л.В. Слепухина и др. // Докл. АН СССР. –1965. – №. 155. – С. 1398-1400.
3. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е.Б. Бурлакова, А.В. Алесенко, Е.М. Молочкина и др. – М: Наука, 1975. – 214 с.
4. Бурлакова, Е.Б. Антиоксиданты в химиотерапии опухолей / Е.Б. Бурлакова, Н.П. Пальмина // Вопросы онкологии. – 1990. – Т. 36, № 10. – С. 1155–1162.
5. Франкфурт, О.С. Влияние 4-метил-2,6-дитретбутилфенола (ионола) на индукцию опухолей печени у крыс / О.С. Франкфурт, Л.П. Липчина, Г.В. Бунта и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1967. Т. 64, № 8. – С. 86–88.
6. Mates, J.M. Antioxidant enzymes and human diseases / J.M. Mates, C. Perez-Gomez, I.N. De Castro // Clin. Biochem. – 1999. – Vol. 32, № 8. – P. 595–603.
7. Emanuel, N.M. Types of experimental delay in aging patterns / N.M. Emanuel, L.K. Obukhova // Exp. Gerontol. –1978. – Vol. 13, № 1–2. –P. 25–29.
8. Edris, A.E. Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review / A.E. Edris // Phytotherapy Res. – 2007. – Vol. 21, № 4. – P. 308–323.
9. Baser, K.H.C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils / K.H.C. Baser // Curr. Pharmacol. Des. – 2008. – Vol. 14, № 29. – P. 3106–3119.
10. Beckman, K.B. The free radical theory of aging matures / K.B. Beckman, B.N. Ames // Physiol. Rev. – 1998. – Vol. 78, № 2. – P. 547–581.
11. Dalton, T.P. Regulation of gene expression by reactive oxygen / T.P. Dalton, H.G. Shertzer, A. Puga // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1999. – Vol. 39, № 1. – P. 67–101.
12. Rhee S.G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger // Experimental & Molecular Medicine. 1999. Vol. 31, № 2. P. 53–59.
13. Richter, C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? / C. Richter // FEBS Lett. – 1988. – Vol. 241, № 1–2. – P. 1–5.
14. Bandyopadhyay, U. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis / U. Bandyopadhyay, D. Das, R.K. Banerjee // Curr. Sci. – 1999. – Vol. 77, № 5. – P. 658–666.

15. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков // М: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 с.
16. Бурлакова, Е.Б. Гибридные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова // Биоантиоксидант. VII Международная конференция. Тезисы докладов. – М: РУДН – 2006. – С. 3–15
17. Бурлакова, Е.Б. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов / Е.Б. Бурлакова, А.А. Конрадов, Е.Л. Мальцева // Хим. физика. – 2003. – Т. 22, № 2. – С. 21–40.
18. Бурлакова, Е.Б. Антиокислительная активность липидов как физико-химический показатель состояния мембранных систем клетки / Е.Б. Бурлакова, М.И. Джалыбова, Е.М. Молочкина // Изв. АН СССР. – 1976. – №6. – С. 51–54.
19. Бурлакова, Е.Б. Влияние липидов мембран на активность ферментов / Е.Б. Бурлакова, М.И. Джалыбова, В.О. Гвахария // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. – М. Наука, 1982. – С. 113 – 140.
20. Pobedimskii, D. Mechanism of antioxidant action in living organisms, in atmospheric oxidation and antioxidants / D. Pobedimskii, E.B. Burlakova // Atmos. Oxi. Antioxi. / ed. J. Scott. – 1993. – Vol. 3, № 9. – P. 223–226.
21. Бурлакова, Е.Б. Кинетический критерий применимости ингибиторов свободнорадикальных процессов в радиобиологии и онкологии / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова, В.Н. Штолько, Н.М. Эмануэль // Докл. АН СССР. – 1966. – Т. 169, № 3. – С. 688–691.
22. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты: вчера, сегодня, завтра / Е.Б. Бурлакова // Биол. кинетика. Сб. обзорных статей. – М: Химия, 2005. – Т. 2. – С. 10–45.
23. Аристархова, С.А. Регуляторная роль взаимосвязи изменений в концентрации антиоксидантов и составе липидов клеточных мембран / С.А. Аристархова, Г.В. Архипова, Г.О. Гвахария и др. – Докл. АН СССР – 1976. – Т. 228, № 1. – С. 215–218.
24. Бурлакова, Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, № 9. – С. 1540–1558.
25. Бурлакова, Е.Б. Роль липидов мембран в передаче и хранении информации (новая модель памяти) / Е.Б. Бурлакова // Ж. физ. химии. – 1989. – Т. 63, № 2. – С. 101–105.
26. Kryston, T.B. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis / T.B. Kryston, A.B. Georgiev, P. Pissis, A. Georgakilas // Mutat. Res. – 2011. – Vol. 711, № 1–2. – P. 193–201.
27. Скулачев, В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма / В.П. Скулачев // Биохимия. – 1999. – Т. 64, № 12. – С. 1679–1688.

28. Nystrom, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / T. Nystrom // *EMBO J.* – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 1311–1317.
29. Zhou, R. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation / R. Zhou, A.S. Yazdi, Ph. Menu, J. Tschopp // *Nature.* – 2011. – Vol. 469, № 7329. – P. 221–225.
30. Palmieri, B. Oxidative stress detection: what for? Part I / B. Palmieri, V. Sblendorio // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2006. – Vol. 10. – P. 291–317.
31. Wessels, I. Immunosenescence of Polymorphonuclear Neutrophils / I. Wessels, J. Jansen, L. Rink, P. Uciechowski // *Sci. World J.* – 2010. – Vol. 10. – P. 145–160.
32. Gomez, C.R. The aging innate immune system / C.R. Gomes, E.D. Boehmer, E.J. Kovacs // *Curr. Opin. Immun.* – 2005. – Vol. 17, № 5. – P. 457–462.
33. Reistad, T. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-a, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C / T. Reistad, E. Mariussen, F. Fonnum // *Toxicol. Sci.* – 2005. – Vol. 83, № 1. – P. 89–100.
34. Gordon, M. Dietary antioxidants in disease prevention / M. Gordon // *Natl. Prod. Rep.* – 1996. – Vol. 13, № 4. – P. 265–273.
35. Bonnefoy, M. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives / M. Bonnefoy, J. Draï, T. Kostka // *Presse medicale.* – 2002. – Vol. 31, № 25. – P. 1174–1184.
36. Clapp, N.K. Effects of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on mortality in BALB/c mice / N.K. Clapp, L.C. Satterfield, N.D. Bowles // *J. Gerontology.* – 1979. – Vol. 34, № 4. – P. 497–501.
37. Comfort, A. Effect of ethoxyquin on the longevity of C3H mice / A. Comfort, I. Youhotsky-Gore, K. Pathmanathan // *Nature.* – 1971. – Vol. 229, № 5282. – P. 254–255.
38. Byers, T. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers / T. Byers, G. Perry // *Ann. Rev. Nutr.* – 1992. – Vol. 12, № 1. – P. 139–159.
39. Flagg, E.W. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans / E.W. Flagg, R.J. Coates, R.S. Greenberg // *J. Am. Coll. Nutr.* – 1995. – Vol. 14, № 5. – P. 419–427.
40. Park, C.H. Vitamin C in leukemia and preleukemia cell growth / C.H. Park // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1988. – Vol. 259. – P. 321–330.
41. Park, C.H. Growth modulation of human leukemic, preleukemic, and myeloma progenitor cells by L-ascorbic acid / C.H. Park, B.F. Kimler // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1991. – Vol. 54, № 6. – P. 1241S–1246S.
42. Копнин, Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения / Б.П. Копнин // *Практическая онкология.* – 2002. – Т. 3, № 4. – С. 229–235.

43. Brown, G.C. Nitric oxide, mitochondria, and cell death / G.C. Brown, V. Borutaite // *IUBMB Life*. – 2001. – Vol. 52, № 3-5. – P. 189–195.
44. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 39, № 1. – P. 44–84.
45. Thannickal, V.J. Reactive oxygen species in cell signaling / V.J. Thannickal, B.L. Fanburg // *Am. J. Physiol.* – 2000. – Vol. 279, № 6. – P. L1005–L1028.
46. Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage / L.J. Marnett // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21, № 3. – P. 361–370.
47. Hollstein, M. p53 mutations in human cancers / M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C.C. Harris // *Science*. – 1991. – Vol. 253, № 5015. – P. 49–53.
48. Pastore, A. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification / A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, F. Piemonte // *Clinica Chimica Acta*. – 2003. – Vol. 333, № 1. – P. 19–39.
49. Valko, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol et al. // *Chem. Biol. Interact.* – 2006. – Vol. 160, № 1. – P. 1–40.
50. Dreher, D. Role of oxygen free radicals in cancer development / D. Dreher, A.F. Junod // *Eur. J. Cancer*. – 1996. – Vol. 32, № 1. – P. 30–38.
51. Valko, M. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence / M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – Vol. 266, № 1-2. – P. 37–56.
52. Эмануэль, Н.М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов / Н.М. Эмануэль. – М: Наука, 1977 – 416 с.
53. Пальмина, Н.П. Влияние альфа-токоферола в широком спектре концентраций (10^{-2} – 10^{-17} М) на активность протеинкиназы С. Связь с пролиферацией и опухолевым ростом / Н.П. Пальмина, Е.Д. Мальцева, Н.В. Курнакова, Е.Б. Бурлакова // *Биохимия*. – 1994. – Т. 59, № 2. С. 193–200.
54. Tannenbaum, S.R. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid / S.R. Tannenbaum, J.S. Wishnok // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1987. – Vol. 498, № 1. – P. 354–363.
55. Tannenbaum, S.R. Reaction of nitrite with vitamins C and E / S.R. Tannenbaum, W. Mergens // *Ann. NY Acad. Sci.* – 1980. – Vol. 355, № 1. – P. 267–277.
56. Tannenbaum, S.R. Inhibition of nitrosamine formation by ascorbic acid / S.R. Tannenbaum, J.S. Wishnok, C.D. Leaf // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1991. – Vol. 53, № 1. – P. 247S–250S.
57. Xu, Y. The effect of Chinese tea on the occurrence of esophageal tumors induced by N-nitrosomethylbenzylamine formed in vivo / Y. Xu, H. Chi // *Biomed. Environ. Sci.* – 1990. – Vol. 3, № 4. – P. 406–412.

58. Mortensen, A. The interaction of dietary carotenoids with radical species / A. Mortensen, L.H. Skibsted, T.G. Truscott // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 385, № 1. – P. 13–19.
59. Parry, J.W. The story of spices / J.W. Parry. – New York: Chemical Publishing Company, 1953. – 208 p.
60. Heber, D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases / D. Heber // *J. Postgrad. Med.* – 2004. – Vol. 50, № 2. – P. 145–149.
61. Cuppett, S.L. Antioxidant activity of the labiatae / S.L. Cuppett, C.A. Hall // *Adv. Food Nutr. Res.* / ed. Steve L. Taylor. – Academic Press, 1998. – Vol. 42. – P. 245–271.
62. Wei, A. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils / A. Wei, T. Shibamoto // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55, № 5. – P. 1737–1742.
63. Nakatani, N. Phenolic antioxidants from herbs and spices / N. Nakatani // *BioFactors.* – 2000. – Vol. 13, № 1. – P. 141–146.
64. Craig, W.J. Health-promoting properties of common herbs / W.J. Craig // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 70, № 3. – P. 491s–499s.
65. Liu, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action / R.H. Liu // *J. Nutr.* – 2004. – Vol. 134, № 12 Suppl. – P. 3479–3485.
66. Wang, L. Health-promoting food ingredients and functional food processing / L. Wang, T. Boh // *Nutr., Well-Being and Health* / ed. Bouayed J. – InTech, 2012 – Available from: <http://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/health-promoting-food-ingredientsdevelopment-and-processing>.
67. Carlsen, M.H. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide / M. H. Carlsen, B. Halvorsen, K. Holte et al. // *Nutr. J.* – 2010. – Vol. 9, № 1. – P. 1–11.
68. Gonzalez-Paramas, A.M. Analysis of flavonoids in foods and biological samples / A. M. Gonzalez-Paramas, C. Santos-Buelga, M. Duenas, S. Gonzales-Manzano // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 11, № 14. – P. 1239–1255.
69. Hammerstone, J.F. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods / J.F. Hammerstone, S.A. Lazarus, H.H. Schmitz // *J. Nutr.* – 2000. – Vol. 130, № 8. – P. 2086S–2092S.
70. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях / М.Н. Запрометов. – М: Наука, 1993. – 272 с.
71. Тутельян, В.А. Флавоноиды: содержание в пищевых продуктах, уровень потребления, биодоступность / В.А. Тутельян, А.К. Батулин, Э.А. Мартиничик // *Вопросы питания.* – 2004. № 6. – С. 43–48.

72. Egert, S. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? / S. Egert, G. Rimbach // *Adv. Nutr.* – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 8–14.
73. Falcone Ferreyra, M.L. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications / M.L. Falcone Ferreyra, S.P. Rius, P. Casati // *Frontiers in plant sci.* – 2012. – Vol. 3, Article №222 – P. 1–15.
74. Miksicek, R.J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity / R.J. Miksicek // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 44, № 1. – P. 37–43.
75. Prasad, K.N. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Alzheimer disease: analysis of biologic rationale / K.N. Prasad, A.R. Hovland, W.C. Cole et al. // *Clinical Neuropharmacol.* – 2000. – Vol. 23, № 1. – P. 2–13.
76. Engelhart, M.J. Dietary intake of antioxidants and risk of alzheimer disease / M.J. Engelhart, M.I. Geerlings, A. Ruitenberget al. // *JAMA.* – 2002. – Vol. 287, № 24. – P. 3223–3229.
77. Yao, L.H. Flavonoids in food and their health benefits / L.H. Yao, Y.M. Jiang, J. Shi et al. // *Plant Food Hum. Nutr.* – 2004. – Vol. 59, № 3. – P. 113–122.
78. Rimm, E.B. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals / E.B. Rimm, M.B. Katan, A. Ascherio et al. // *Ann. Int. Med.* – 1996. – Vol. 125, № 5. – P. 384–389.
79. Rigopoulos, D. Randomized placebo-controlled trial of a flavonoid-rich plant extract-based cream in the treatment of rosacea / D. Rigopoulos, D. Kalogeromitros, S. Gregoriou et al. // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* – 2005. – Vol. 19, № 5. – P. 564–568.
80. Frank, B. A review of antioxidants and Alzheimer's disease / B. Frank, S. Gupta // *Ann. Clinic. Psych.* – 2005. – Vol. 17, № 4. – P. 269–286.
81. Weinreb, O. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases / O. Weinreb, S. Mandel, T. Amit, M. Youdim // *J. Nutr. Biochem.* – 2004. – Vol. 15, № 9. – P. 506–516.
82. Kelsey, N.A. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents / N.A. Kelsey, H.M. Wilkins, D.A. Linseman // *Molecules.* – 2010. – Vol. 15, № 11. – P. 7792–7814.
83. Williams, R.J. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? / R.J. Williams, J.P.E. Spencer, C. Rice-Evans // *Free Radical Biol. Med.* – 2004. – Vol. 36, № 7. – P. 838–849.
84. Kumar, S. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview / S. Kumar, A.K. Pandey // *Sci. World J.* – 2013. – Vol. 2013 – P. 1-16.
85. Lewandowska, U. Flavanols from evening primrose (*Oenothera paradoxa*) defatted seeds inhibit prostate cells invasiveness and cause changes in Bcl-2/Bax mRNA ratio / U. Lewandowska, K. Szewczyk, K. Owczarek et.al // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – Vol. 61, № 12. – P. 2987–2998.

86. Kim, I.-S. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices / I.-S. Kim, M.-R. Yang, O.-H. Lee, S.-N. Kang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12, № 6. – P. 4120–4131.
87. de Barros Viana, G. S. Role of plant extracts and polyphenolic compounds in oxidative stress-related diseases / G. S. de Barros Viana, A. Luzia Kalyne, L. Moreira et al. // *Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects* / ed. Kozyrev D., Slutsky V. – NY: Nova Science Publishers, 2010. – P. 449–477.
88. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols / R. Tsao // *Nutrients.* – 2010. – Vol. 2, № 12. – P. 1231–1246.
89. Scalbert, A. Dietary intake and bioavailability of polyphenols / A. Scalbert, G. Williamson // *J. Nutr.* – 2000. – Vol. 130, № 8. – P. 2073S–2085S.
90. Choy, Y.Y. Bioavailability of Intact Proanthocyanidins in the Rat Colon after Ingestion of Grape Seed Extract / Y.Y. Choy, G.K. Jagers, P. Oteiza et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – Vol. 61, № 1. – P. 121–127.
91. Wachenroder, H. Concerning the oil extracted from carrot roots, carotene, carotene sugars and components of carrots juice / H. Wachenroder // *Geiger's Magaz. Pharm.* – 1831. № 33. – P. 144–172.
92. Clenshaw, E. The nature of the unsaponifiable fraction of the lipid matter extracted from green leaves / E. Clenshaw, I. Smedley-Maclean // *Biochem. J.* – 1929. – Vol. 23, № 1. – P. 107–109.
93. Ettre, L.S. Twett and the discovery of chromatography. I: Early work (1899-1903) / L.S. Ettre, K.I. Sakodynskii // *Chromatographia.* – 1993. – Vol. 35, № 3-4. – P. 223–231.
94. Goodwin, T.W. Carotenoids / T.W. Goodwin // *Ann. Rev. Biochem.* – 1955. – Vol. 24. – P. 497–522.
95. Buxton, L.O. The carotenoids in forage / L.O. Buxton, B.A. Dombrow // *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* – 1938. – Vol. 10, № 5. – P. 262–263.
96. Moore, T. Vitamin A and carotene / T. Moore // *Biochem. J.* – 1930. – Vol. 24, № 3. – P. 692–702.
97. Wald, G. Vitamin A in the Retina / G. Wald // *Nature.* – 1933. – Vol. 132, № 3330. – P. 316–317.
98. Nkondjock, A. Dietary intake of lycopene is associated with reduced pancreatic cancer risk / A. Nkondjock, P. Ghadirian, K. Johnson, D. Krewski // *J. Nutr.* – 2005. – Vol. 135, № 3. – P. 592–597.
99. Xu, W.-H. Nutritional factors in relation to endometrial cancer: A report from a population-based case-control study in Shanghai, China / W.-H. Xu, Q. Dai, Y.-B. Xiang et al. // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 120, № 8. – P. 1776–1781.

100. Montonen, J. Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes / J. Montonen, P. Knekt, R. Jarvinen, A. Reunanen // *Dia. Care.* – 2004. – Vol. 27, № 2. – P. 362–366.
101. Homburger, F. The carcinogenicity of essential oils, flavors, and spices: a review / F. Homburger, E. Boger // *Cancer Res.* – 1968. – Vol. 28, № 11. – P. 2372–2374.
102. Dudareva, N. Biochemistry of plant volatiles / N. Dudareva, E. Pichersky, J. Gershenzon // *Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 135, № 4. – P. 1893–1902.
103. Husnu, K. Chemistry of essential oils / K. Husnu, C. Baser, F. Demirci // *Flavours and Fragrances* / ed. Berger P.D.R.G. – Springer Berlin Heidelberg, 2007. – P. 43–86.
104. Anilakumar, K.R. Effect of coriander seeds on hexachlorocyclohexane induced lipid peroxidation in rat liver / K.R. Anilakumar, N.S. Nagaraj, K. Santhanam // *Nutr. Res.* – 2001. – Vol. 21, № 11. – P. 1455–1462.
105. Banerjee, S. Influence of certain essential oils on carcinogen-metabolizing enzymes and acid-soluble sulfhydryls in mouse liver / S. Banerjee, R. Sharma, R.K. Kale, A.R. Rao // *Nutr. Cancer.* – 1994. – Vol. 21, № 3. – P. 263–269.
106. Bhattacharjee, S. Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of GST activity by cardamom and cinnamon during chemically induced colon carcinogenesis in Swiss albino mice / S. Bhattacharjee, T. Rana, A. Sengupta // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2007. – Vol. 8, № 4. – P. 578–582.
107. Kapoor, I.P.S. Chemistry and antioxidant activity of essential oil and oleoresins of black caraway (*Carum bulbocastanum*) fruits: Part 69 / I.P.S. Kapoor, B. Singh, G. Singh et al. // *J. Sci. Food Agric.* – 2010. – Vol. 90, № 3. – P. 385–390.
108. Мишарина, Т.А. Влияние приема малых доз эфирных масел на антиоксидантный статус эритроцитов, печени и мозга мышей / Т.А. Мишарина, Л.Д. Фаткуллина, Е.С. Алинкина и др. // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 2014. – Т. 50, № 1. – С. 101–107.
109. Dhuley, J.N. Anti-oxidant effects of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark and greater cardamom (*Amomum subulatum*) seeds in rats fed high fat diet / J.N. Dhuley // *Indian J. Exp. Biol.* – 1999. – Vol. 37, № 3. – P. 238–242.
110. Eslick, G.-D. *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence / G.-D. Eslick // *World J. Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12, № 19. – P. 2991–2999.
111. Farinha, P. *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma / P. Farinha, R.D. Gascoyne // *Gastroenterology.* – 2005. – Vol. 128, № 6. – P. 1579–1605.
112. Aruna, K. Plant products as protective agents against cancer / K. Aruna, V.M. Sivaramakrishnan // *Indian J. Exp. Biol.* – 1990. – Vol. 28, № 11. – P. 1008–1011.

113. Kim, J.-K. [6]-Gingerol prevents UVB-induced ROS production and COX-2 expression in vitro and in vivo / J.-K. Kim, Y. Kim, K.-M. Na et al. // *Free Radical Res.* – 2007. – Vol. 41, № 5. – P. 603–614.
114. Ahmed, R.S. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats / R.S. Ahmed, V. Seth, S.T. Pasha, B.D. Banerjee // *Food Chem. Toxicol.* – 2000. – Vol. 38, № 5. – P. 443–450.
115. Ahmed, R.S. Protective effects of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc.) on lindane-induced oxidative stress in rats / R.S. Ahmed, S. Suke, V. Seth et al. // *Phytotherapy Res.* – 2008. – Vol. 22, № 7. – P. 902–906.
116. Ahmed, R.S. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc) on antioxidant defense system in rat: comparison with ascorbic acid / R.S. Ahmed, V. Seth, B.D. Banerjee // *Indian J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 38, № 6. – P. 604–606.
117. Reddy, A.C. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes / A.C. Reddy, B.R. Lokesh // *Mol. Cell. Biochem.* – 1992. – Vol. 111, № 1-2. – P. 117–124.
118. Shobana, S. Antioxidant activity of selected Indian spices / S. Shobana, K.A. Naidu // *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* – 2000. – Vol. 62, № 2. – P. 107–110.
119. Kota, N. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet / N. Kota, P. Krishna, K. Polasa // *Food Chem.* – 2008. – Vol. 106, № 3. – P. 991–996.
120. Halvorsen, B.L. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants / B.L. Halvorsen, K. Holte, M. Myhrstad et al. // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 132, № 3. – P. 461–471.
121. Jagetia, G. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.), a dietary supplement, protects mice against radiation-induced lethality: mechanism of action / G. Jagetia, M. Baliga, P. Venkatesh // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2004. – Vol. 19, № 4. – P. 422–435.
122. Kluth, D. Modulation of pregnane X receptor-and electrophile responsive element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds / D. Kluth, A. Banning, I. Paur et al. // *Free Radical Biol. Med.* – 2007. – Vol. 42, № 3. – P. 315–325.
123. Al-Rehaily, A.J. Ethnopharmacological studies on allspice (*Pimenta dioica*) in laboratory animals / A.J. Al-Rehaily, M.S. Al-Said, M.A. Al-Yahya et al. // *Pharm. Biology.* – 2002. – Vol. 40, № 3. – P. 200–205.
124. Rompelberg, C. Effect of short-term dietary administration of eugenol in humans / C. Rompelberg, J. Vogels, N. de Vogel et al. // *Hum. Exp. Toxicol.* – 1996. – Vol. 15, № 2. – P. 129–135.

125. Billing, J. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot / J. Billing, P.W. Sherman // *Quart. Rev. Biol.* – 1998. – Vol. 73, № 1. – P. 3–49.
126. Lee, Y.-H. Anti-histone acetyltransferase activity from allspice extracts inhibits androgen receptor-dependent prostate cancer cell growth / Y.-H. Lee, S.-W. Hong, W. Jun et al. // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 2007. – Vol. 71, № 11. – P. 2712–2719.
127. Mazaki, M. Inhibitory effects of caraway (*Carum carvi* L.) and its component on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mutagenicity / M. Mazaki, K. Kataoka, T. Kinouchi // *J. Med. Invest.* – 2006. – Vol. 53, № 1. – P. 123–133.
128. Shwaireb, M.H. Caraway oil inhibits skin tumors in female BALB/c mice / M.H. Shwaireb // *Nutr. Cancer.* – 1993. – Vol. 19, № 3. – P. 321–325.
129. Kikuzaki, H. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging active compounds from greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) / H. Kikuzaki, Y. Kawai, N. Nakatani // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* – 2001. – Vol. 47, № 2. – P. 167–171.
130. Ihlaseh, S.M. Chemopreventive property of dietary ginger in rat urinary bladder chemical carcinogenesis / S.M. Ihlaseh, M. de Oliveira, E. Teran et al. // *World J. Urol.* – 2006. – Vol. 24, № 5. – P. 591–596.
131. Bidinotto, L.T. Effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on DNA damage and development of urothelial tumors in a mouse bladder carcinogenesis model / L.T. Bidinotto, A. Spinardi-Barbisan, N. Rocha et al. // *Environ. Mol. Mutag.* – 2006. – Vol. 47, № 8. – P. 624–630.
132. Huang, M.T. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid / M.T. Huang, C.T. Ho, Z.Y. Wang et al. // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54, № 3. – P. 701–708.
133. Singletary, K. Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation / K. Singletary, C. MacDonald, M. Wallig // *Cancer Lett.* – 1996. – Vol. 104, № 1. – P. 43–48.
134. Yesil-Celiktas, O. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines / O. Yesil-Celiktas, C. Sevimli, E. Bedir, F. Vardar-Sukan et al. // *Plant Food Hum. Nutr.* – 2010. – Vol. 65, № 2. – P. 158–163.
135. Morita, T. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury / T. Morita, K. Jinno, H. Kawagishi et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, № 6. – P. 1560–1565.

136. Ahmad, H. Preferential overexpression of a class MU glutathione s-transferase subunit in mouse liver by myristicin / H. Ahmad, M.T. Tijerina, A.S. Tobola // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 1997. – Vol. 236, № 3. – P. 825–828.
137. Zheng, G. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced tumorigenesis by myristicin, a volatile aroma constituent of parsley leaf oil / G. Zheng, P. Kenney, J. Zhang, L. Lam // *Carcinogenesis.* – 1992. – Vol. 13, № 10. – P. 1921–1923.
138. Lee, B.K. Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells / B.K. Lee, J. Kim, J. Jung et al. // *Toxicol. Lett.* – 2005. – Vol. 157, № 1. – P. 49–56.
139. Henderson, C.J. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases / C.J. Henderson, A. Smith, J. Ure et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95, № 9. – P. 5275–5280.
140. Mulder, T.P. Glutathione S-transferase pi in colorectal tumors is predictive for overall survival / T.P. Mulder, H.W. Verspaget, C.F. Sier et al. // *Cancer Res.* – 1995. – Vol. 55, № 12. – P. 2696–2702.
141. Carnesecchi, S. Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-Fluorouracil treatment / S. Carnesecchi, K. Langley, F. Exinger et al. // *J. Pharm. Exp. Therap.* – 2002. – Vol. 301, № 2. – P. 625–630.
142. Edris, A.E. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) grown in Siwa Oasis, Egypt / A.E. Edris, A.S. Shalaby, H.M. Fadel, M.A. Abdel-Wahab et al. // *Eur. Food Res. Tech.* – 2003. – Vol. 218, № 1. – P. 74–78.
143. Guyton, K.Z. Prevention of liver cancer / K.Z. Guyton, T.W. Kensler // *Curr. Oncol. Rep.* – 2002. – Vol. 4, № 6. – P. 464–470.
144. Maltzman, T.H. Effects of monoterpenoids on in vivo DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes / T.H. Maltzman, M. Christou, M. Gould, C. Jefcoate et al. // *Carcinogenesis.* – 1991. – Vol. 12, № 11. – P. 2081–2087.
145. Stratton, S.P. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer / S.P. Stratton, R.T. Dorr, D.S. Alberts // *Eur. J. Cancer.* – 2000. – Vol. 36, № 10. – P. 1292–1297.
146. Lu, X.-G. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene / X.-G. Lu, L. Zhan, B. Feng et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 10, № 14. – P. 2140–2144.
147. Kaji, I. Inhibition by D-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21ras plasma membrane association / I. Kaji, M. Tatsuta, H. Iishi et al. // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 93, № 3. – P. 441–444.

148. Del Toro-Arreola, S. Effect of d-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma / S. Del Toro-Arreola, E. Flores-Torales, C. Torres-Lozano et al. // *Int. Immunopharm.* – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 829–838.
149. Loutrari, H. Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor / H. Loutrari, M. Hatzia Apostolou, V. Skouridou et al. // *J. Pharm. Exp. Therap.* – 2004. – Vol. 311, № 2. – P. 568–575.
150. Rajesh, D. Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma / D. Rajesh, R.A. Stenzel, S.P. Howard // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 38. – P. 35968–35978.
151. Bardon, S. Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression / S. Bardon, V. Foussard, S. Fournel, A. Loubat // *Cancer Lett.* – 2002. – Vol. 181, № 2. – P. 187–194.
152. Burke, Y.D. Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention / Y.D. Burke, A. Ayoubi, S. Werner et al. // *Anticancer res.* – 2002. – Vol. 22, № 6A. – P. 3127–3134.
153. Azzoli, C.G. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors / C.G. Azzoli, V. Miller, K. Ng et al. // *Cancer Chemother. Pharm.* – 2003. – Vol. 51, № 6. – P. 493–498.
154. Meadows, S.M. Phase II trial of perillyl alcohol in patients with metastatic colorectal cancer / S.M. Meadows, D. Mulkerin, J. Berlin et al. // *Int. J. Gastrointestinal Cancer.* – 2002. – Vol. 32, № 2-3. – P. 125–128.
155. Duetz, W.A. Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants / W.A. Duetz, H. Bouwmeester, J.B. van Beilen, B. Witholt // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 61, № 4. – P. 269–277.
156. Cavalieri, E. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells / E. Cavalieri, S. Mariotto, C. Fabrizi et al. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2004. – Vol. 315, № 3. – P. 589–594.
157. Moteki, H. Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line / H. Moteki, H. Hibasami, Y. Yamada et al. // *Oncology rep.* – Vol. 9, № 4. – P. 757–760.
158. Calcabrini, A. Terpinen-4-ol, the main component of melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells / A. Calcabrini, A. Stringaro, L. Toccacielci et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2004. – Vol. 122, № 2. – P. 349–360.
159. Brophy, J.J. Gas chromatographic quality control for oil of Melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree) / J.J. Brophy, N. Davies, I. Southwell et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 1989. – Vol. 37, № 5. – P. 1330–1335.

160. Luigi Mondello, P.D. Automated HPLC-HRGC: A powerful method for essential oils analysis. Part V. identification of terpene hydrocarbons of bergamot, lemon, mandarin, sweet orange, bitter orange, grapefruit, clementine and mexican lime oils by coupled HPLC-HRGC-MS(ITD) / P.D. Luigi Mondello // *Flavour and Fragrance J.* – 2006. – Vol. 10, № 1. – P. 33 – 42.
161. Takahashi, Y. Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein in vitro / Y. Takahashi, N. Inaba, S. Kuwahara, W. Kuki // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 2003. – Vol. 67, № 1. – P. 195–197.
162. Milner, J.A. A historical perspective on garlic and cancer / J.A. Milner // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131, № 3. – P. 1027S–1031S.
163. Hamada, S. Expression of glutathione S-transferase-pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy / S. Hamada, M. Kamada, H. Furumoto et al. // *Gynecol. Oncol.* – 1994. – Vol. 52, № 3. – P. 313–319.
164. Thomson, M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent / M. Thomson, M. Ali // *Curr. Cancer Drug Targ.* – 2003. – Vol. 3, № 1. – P. 67–81.
165. Lamm, D.L. The potential application of *Allium sativum* (garlic) for the treatment of bladder cancer / D.L. Lamm, D.R. Riggs // *Urol. Clinics N. Am.* – 2000. – Vol. 27, № 1. – P. 157–162.
166. Powolny, A.A. Multitargeted prevention and therapy of cancer by diallyl trisulfide and related *Allium* vegetable-derived organosulfur compounds / A.A. Powolny, S.V. Singh // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 269, № 2. – P. 305–314.
167. Teissedre, P.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties / P.L. Teissedre, A.L. Waterhouse // *J. Agric. Food Chem.* – 2000. – Vol. 48, № 9. – P. 3801–3805.
168. Ehrnhofer-Ressler, M.M. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor, and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia Officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts / M.M. Ehrnhofer-Ressler, K. Fricke, M. Pignitter, J.M. Walker et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – Vol. 61. – P. 3443–3450.
169. Mansour, M.A. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone / M.A. Mansour, O.T. Ginawi, T. El-Hadiyah et al. // *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharm.* – 2001. – Vol. 110, № 3-4. – P. 239–251.
170. Ali, B.H. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa* / B.H. Ali, G. Blunden // *Phytotherapy Res.* – 2003. – Vol. 17, № 4. – P. 299–305.

171. Naderi, G.A. Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors / G.A. Naderi, S. Asgary, M. Ani et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – Vol. 267, № 1-2. – P. 59–66.
172. Sivropoulou, A. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils / A. Sivropoulou, E. Papanikolaou, C. Nikolaou et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 1996. – Vol. 44, № 5. – P. 1202–1205.
173. Kalembe, D. Antibacterial and antifungal properties of essential oils / D. Kalembe, A. Kunicka // *Curr. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 10, № 10. – P. 813–829.
174. Dietrich, G. Repellent activity of fractioned compounds from *Chamaecyparis nootkatensis* essential oil against nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) / G. Dietrich, M. Dolan, J. Peralta-Cruz et al. // *J. Med. Entomol.* – 2006. – Vol. 43, № 5. – P. 957–961.
175. Karpouhtsis, I. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils / I. Karpouhtsis, E. Pardali, E. Feggou et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – Vol. 46, № 3. – P. 1111–1115.
176. Force, M. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo / M. Force, W.S. Sparks, R.A. Ronzio // *Phytotherapy Res.* – 2000. – Vol. 14, № 3. – P. 213–214.
177. Sokmen, M. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens* / M. Sokmen, J. Serkedjieva, D. Daferera et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52, № 11. – P. 3309–3312.
178. Alma, M.H. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey / M.H. Alma, A. Mavi, A. Yildirim et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2003. – Vol. 26, № 12. – P. 1725–1729.
179. Aydin, S. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes / S. Aydin, A.A. Basaran, N. Basaran // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53, № 4. – P. 1299–1305.
180. Baser, K.H.C. A comparative study of the essential oils of wild and cultivated *Satureja hortensis* L / K.H.C. Baser, T. Ozek, N. Kirimer, G. Tumen // *J. Essen. Oil Res.* – 2004. – Vol. 16, № 5. – P. 422–424.
181. Мишарина, Т.А. Антиоксидантные свойства эфирных масел / Т.А. Мишарина, М.Б. Теренина, Н.И. Крикунова // *Прикл. биохимия и микробиол.* – 2009. – Т. 45, № 6. – С. 642–647.
182. Gulluce, M. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L / M. Güllüce, M. Sokmen, D. Daferera et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – Vol. 51, № 14. – P. 3958–3965.

183. Hajhashemi, V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil / V. Hajhashemi, A. Ghannadi, S.K. Pezeshkian // *J. Ethnopharm.* – 2002. – Vol. 82, № 2-3. – P. 83–87.
184. Mosaffa, F. Antigenotoxic effects of *Satureja hortensis* L. on rat lymphocytes exposed to oxidative stress / F. Mosaffa, J. Behravan, G. Karimi, M. Iranshahi // *Arch. Pharm. Res.* – 2006. – Vol. 29, № 2. – P. 159–164.
185. Saad, N.Y. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components / N.Y. Saad, C.D. Muller, A. Lobstein // *Flavour and Fragrance J.* – 2013. – Vol. 28, № 5. – P. 269–279.
186. Ultee, A. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* / A. Ultee, M.H.J. Bennik, R. Moezelaar // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68, № 4. – P. 1561–1568.
187. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review / S. Burt // *Int. J. Food Microbiol.* – 2004. – Vol. 94, № 3. – P. 223–253.
188. Juven, B.J. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents / B.J. Juven, J. Kanner, F. Schved, H. Weisslowicz // *J. Appl. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 76, № 6. – P. 626–631.
189. Bassole, I.H.N. Essential oils in combination and their antimicrobial properties / I.H.N. Bassole, H.R. Juliani // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17, № 4. – P. 3989–4006.
190. Zhou, F. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium* / F. Zhou, B. Ji, H. Zhang et al. // *J. Food Safety.* – 2007. – Vol. 27, № 2. – P. 124–133.
191. Pei, R.-S. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method / R.-S. Pei, F. Zhou, B.-P. Ji, J. Xu // *J. Food Sci.* – 2009. – Vol. 74, № 7. – P. 379–383.
192. Kahl, R. Toxikologie der synthetischen Antioxidantien BHA und BHT in Vergleich mit dem natürlichen Antioxidans Vitamin E / R. Kahl, H. Kappus // *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* – 1993. – Vol. 196, № 4. – P. 329–338.
193. Lindenschmidt, R.C. The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice / R.C. Lindenschmidt, A.F. Tryka, M.E. Goad, H.P. Witschi // *Toxicology.* – 1986. – Vol. 38, № 2. – P. 151–160.
194. Cozzi, R. Ascorbic acid and beta-carotene as modulators of oxidative damage / R. Cozzi, R. Ricordy, T. Aglitti et al. // *Carcinogenesis.* – 1997. – Vol. 18, № 1. – P. 223–228.

195. Marinova, E.M. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil / E.M. Marinova, N.V. Yanishlieva // *Food Chem.* – 1997. – Vol. 58, № 3. – P. 245–248.
196. Aeschbach, R. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol / R. Aeschbach, J. Loliger, B.C. Scott et al. // *Food Chem. Toxicol.* – 1994. – Vol. 32, № 1. – P. 31–36.
197. Lagouri, V. Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown wild in Greece / V. Lagouri, G. Blekas, M. Tsimidou et al. // *Z Lebensm Unters Forch.* – 1993. – Vol. 197, № 1. – P. 20–23.
198. Bostancioglu, R.B. Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of *Origanum onites* L. essential oil / R.B. Bostancioglu, M. Kurkcuoglu, K. Baser, A. Koparal // *Food Chem. Toxicol.* – 2012. – Vol. 50, № 6. – P. 2002–2008.
199. Lam, L.K.T. Effects of essential oils on glutathione S-transferase activity in mice / L.K.T. Lam, B.L. Zheng // *J. Agric. Food Chem.* – 1991. – Vol. 39, № 4. – P. 660–662.
200. Zeytinoglu, M. Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis in rats / M. Zeytinoglu, S. Aydin, Y. Ozturk et al. // *Acta Pharm. Turcica.* – 1998. – Vol. 40. – P. 93–98.
201. Koparal, A.T. Effects of carvacrol on a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, a549 / A.T. Koparal, M. Zeytinoglu // *Cytotechnology.* – 2003. – Vol. 43, № 1-3. – P. 149–154.
202. Pilotti, A. Effects of tobacco and tobacco smoke constituents on cell multiplication in vitro / A. Pilotti, K. Ancker, E. Arrhenius, C. Enzell // *Toxicology.* – 1975. – Vol. 5, № 1. – P. 49–62.
203. He, L. Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo / L. He, H. Mo, S. Hadisusilo et al. // *J. Nutr.* – 1997. – Vol. 127, № 5. – P. 668–674.
204. Jaafari, A. Differential antitumor effect of essential oils and their major components of *Thymus broussonetii*: relationship to cell cycle and apoptosis induction / A. Jaafari, H.A. Mouse, L.A. M'Bark et al. // *Herba Polonica.* – 2009. – Vol. 55, № 2. – P. 36–50.
205. Беспалов, В.Г. Антиканцерогенный эффект фенольного антиоксиданта фенозана (4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенилпропионовой кислоты) на спонтанный канцерогенез у крыс и мышей / В.Г. Беспалов, В.А. Александров, Д.Б. Корман // *Сиб. онкол. ж.* – 2012. – Т. 50, № 2. – С. 52–56.
206. Pandey, K.B. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease / K.B. Pandey, S.I. Rizvi // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2009. – Vol. 2, № 5. – P. 270–278.
207. King, R.A. The role of polyphenols in human health / R.A. King // Adelaide: ACIAR, 1999. – P. 75–81.

208. Pryor, W.A. Beta carotene: from biochemistry to clinical trials /W.A. Pryor, W. Stahl, C.L. Rock // *Nutr. Rev.* – 2000. – Vol. 58, № 2 Pt 1. – P. 39–53.
209. Ebbesen, P. Life span, leukaemia and amyloid incidences of untreated and polycation-treated AKR mice / P. Ebbesen // *Br. J. Cancer.* – 1978. – Vol. 37, № 1. – P. 76–80.
210. Банкова, В. В. Роль малонового диальдегида в регуляции перекисного окисления липидов в норме и патологии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Банкова Валентина Васильевна. – М., 1990. – 38 с.
211. Mihara, M. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency / M. Mihara, M. Uchiyama, K. Fukuzawa // *Biochem. Med.* – 1980. – Vol. 23, № 3. – P. 302–311.
212. Fridovich, I. Superoxide Dismutases / I. Fridovich // *Ann. Rev. Biochem.* – 1975. – Vol. 44, № 1. – P. 147–159.
213. Mills, G.C. The Purification and Properties of Glutathione Peroxidase of Erythrocytes / G.C. Mills // *J. Biol. Chem.* – 1959. – Vol. 234, № 3. – P. 502–506.
214. Мальцев, Г.Ю. Методы определения содержания глутатиона и активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / Г.Ю. Мальцев, Н.В. Тышко // *Гигиена и санитария.* – 2002. № 2. – С. 69–72.
215. Habig, W.H. Glutathione s-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation / W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby // *J. Biol. Chem.* – 1974. – Vol. 249, № 22. – P. 7130–7139.
216. Lepage, G. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction / G. Lepage, C.C. Roy // *J. Lipid Res.* – 1986. – Vol. 27, № 1. – P. 114–120.
217. Пат. 2475258 Российская Федерация, МПК А 61 К 36/53, А 61 Р 43/00. Профилактическое средство, способствующее увеличению продолжительности жизни (варианты) / Е.Б. Бурлакова, С.Д. Варфоломеев, Т.А. Мишарина, Л.Д. Фаткуллина, А.К. Воробьева и др.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. – № 2011145158/15; заявл. 09.11.2011; опубл. 20.02.2013, Бюл. №5.
218. Vorobyova, A.K. Effect of long-term administration of essential oils on the fatty acid composition of mice organs / A.K. Vorobyova, E.S. Alinkina, T.A. Misharina, L.D. Fatkullina, M.B. Terenina, N.I. Krikunova, E.B. Burlakova // In: *Modern Problems in Biochemical Physics: New Horizont.* – Ed.: G. E. Zaikov, S. D. Varfolomeev, E.B. Burlakova and A. A. Popov. – Nova Science Publ., Inc. New York. – 2012. – Ch.31. – P.247–253.

219. Бурлакова, Е.Б. Противораковое и профилактическое действие малых доз эфирных масел на мышей / Е.Б. Бурлакова, Т.А. Мишарина, А.К. Воробьева, Л.Д. Фаткуллина, Е.С. Алинкина // Материалы V Всероссийской конференции с межд. участием «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул: АГУ. – 2012. – С. 324–326.
220. Zou, S. Prolongevity effects of a botanical with oregano and cranberry extracts in Mexican fruit flies: examining interactions of diet restriction and age / S. Zou, J. Carey, P. Liedo et al. // AGE. – 2012. – Vol. 34, № 2. – P. 269–279.
221. Babili, F.E. Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities / F.E. Babili, J. Bouajila, J. Souchard et al. // J. Food Sci. – 2011. – Vol. 76, № 3. – P. C512–C518.
222. Алинкина, Е.С. Цитогеронтологические исследования биологической активности эфирного масла орегано / Е.С. Алинкина, А.К. Воробьева, Т.А. Мишарина, Л.Д. Фаткуллина, Е.Б. Бурлакова, А.Н. Хохлов // Вестник МГУ. Сер. 16. Биология. – 2012. – № 2. – С.13–18.
223. Slaménova, D. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured in vitro / D. Slaménova, E. Horvathova, M. Sramkova, L. Marsalkova // Neoplasma. – 2007. – Vol. 54, № 2. – P. 108–112.
224. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies / A.N. Khokhlov // Ann. NY Acad. Sci. – 1992. – Vol. 663, № 1. – P. 475–476.
225. Khokhlov A.N. The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies / A.N. Khokhlov // Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Ed. by F. Licastro and C. M. Caldarera. – CLUEB Bologna, – 1992. – P. 209–216.
226. Чиркова, Э.Ю. Клеточно-кинетическая модель для изучения геропротекторов и геропромоторов / Э.Ю. Чиркова, М.Э. Головина, Т.Л. Наджарян, А.Н. Хохлов // Док. АН СССР. – 1984. – Т. 278, № 6. – С. 1474–1476.
227. Khokhlov, A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies / A.N. Khokhlov // Biophysics. 2010. – Vol. 55, № 5. – P. 859–864.
228. Koroch, A.R. Bioactivity of essential oils and their components / A.R. Koroch, H.R. Juliani, J. A. Zygadlo // Flavours and Fragrances / ed. P.D.R.G. Berger. – Springer Berlin Heidelberg, 2007. – P. 87–115.
229. Онасенко, Е. С. Инфицирование животных вирусом гриппа после предварительного введения препарата “Криоцелл-гемокорд”. Сообщение I. Изучение функциональной

- активности иммунокомпетентных органов мышей / Е. С. Онасенко, Е.В. Бровко, В.В. Волина, В.Л. Понамарева // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, № 1. – С. 99–105.
230. Алинкина, Е.С. Антиоксидантные и антирадикальные свойства эфирных масел *in vivo* и *in vitro*: дисс. ... канд. биол. наук. – М.: ИБХФ РАН, 2013. – 148 с.
231. Connor, J. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process / J. Connor, C.H. Pak, R.F. Zwaal // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267, № 27. – P. 19412–19417.
232. Watanabe, H. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium / H. Watanabe, A. Kobayashi, T. Yamamoto et al. // Free Radical Biol. Med. – 1990. – Vol. 8, № 6. – P. 507–514.
233. Сторожок, С.А. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу / С.А. Сторожок, Л.Ф. Панченко, Ю.Д. Филиппович, В.С. Глушков // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 2. – С. 198–208.
234. Подчуфарова, Д.Е. Биомаркеры окислительного стресса в эритроцитах больных при некоторых формах психической патологии / Д.Е. Подчуфарова, Л.Д. Фаткуллина, Т.П. Ключник и др. // Тез. док. VIII Межд. конф. – М: РУДН, 2010. – С. 372–373.
235. Shishkina, L. Changes in the lipid peroxidation systems in tissues from various rodent species during aging / L. Shishkina, M.A. Smotrieva, M.A. Klimovich et al. // Adv. gerontol. – 2008. – Vol. 21, № 3. – P. 513–515.
236. Hazel, J. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment / J. Hazel // Prog. Lipid Res. – 1990. – Vol. 29, № 3. – P. 167–227.
237. Youdim, K.A. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain / K.A. Youdim, S.G. Deans // Br. J. Nutr. – 2000. – Vol. 83, № 1. – P. 87–93.
238. Uauy R. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids / R. Uauy, A.D. Dangour // Nutr. Rev. – 2006. – Vol. 64, № 5 Pt 2. – P. S24–33.
239. Uauy, R. Essential fatty acids in visual and brain development / R. Uauy, D.R. Hoffman, P. Peirano et al. // Lipids. – 2001. – Vol. 36, № 9. – P. 885–895.
240. Бурлакова, Е.Б. Торможение процессов старения мышей при приеме композиции эфирных масел / Е.Б. Бурлакова, Т.А. Мишарина, А.К. Воробьева, Е.С. Алинкина, Л.Д. Фаткуллина, М.Б. Теренина, Н.И. Крикунова // Доклады РАН. – 2012. – Т.444, № 6. – С.676–679.

241. Мишарина, Т.А. Влияние эфирного масла орегано на прививаемость и развитие карциномы Льюис у мышей-гибридов F1 DBA C57 Black / Т.А. Мишарина, Е.Б. Бурлакова, Л.Д. Фаткуллина, Е.С. Алинкина, А.К. Воробьева, И.Б. Медведева, В.Н. Ерохин, В.А. Семенов, Л.Г. Наглер, А.И. Козаченко // Прикл. биохимия и микробиол. – 2013. – Т.49, № 4. – С.423–428.
242. Bukovska, A. Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice / A. Bukovska, S. Cikos, S. Juhas et al. // *Media. Inflamm.* – 2007. – Vol. 2007. – P. 1–9.
243. Вартамян, Л.С. Дисбаланс в ферментной системе генерирования и утилизации активных форм кислорода в печени мышей линии AKR в процессе развития спонтанного лейкоза / Л.С. Вартамян, С.М. Гуревич, А.И. Козаченко и др. // *Биохимия.* – 2001. – Т. 66, № 7. – С. 896–904.
244. Lam, L.K. Inhibition of benzo[α]pyrene-induced forestomach neoplasia in mice by citrus limonoids / L.K. Lam, S. Hasegawa // *Nutr. Cancer.* – 1989. – Vol. 12, № 1. – P. 43–47.
245. Бурлакова, Е.Б. Влияние летучих антиоксидантов растительного происхождения на развитие спонтанного лейкоза у мышей / Е.Б. Бурлакова, В.Н. Ерохин, Т.А. Мишарина, Л.Д. Фаткуллина, А.В. Кременцова, В.А. Семенов, М.Б. Теренина, А.К. Воробьева, А.Н. Голощапов // *Известия РАН. Сер. биол.* – 2010. – Т.37, № 6. – С.711–718.
246. Бландова, З.К. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований / З.К. Бландова, В.А. Душкин, А.М. Милашенко и др. – М: Наука, 1983. – 192 с.
247. Ерохин, В.Н. Спонтанный лейкоз–модель для изучения эффектов малых и сверхмалых доз физических и физико-химических воздействий на опухолевый процесс / В.Н. Ерохин, Е.Б. Бурлакова // *Радиационная биология и радиационная экология.* – 2003. – Т. 43, № 2. – С. 237–241.
248. Ruberto, G. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems / G. Ruberto, M.T. Baratta // *Food Chem.* – 2000. – Vol. 69, № 2. – P. 167–174.
249. Hercberg, S. The history of β -carotene and cancers: from observational to intervention studies. What lessons can be drawn for future research on polyphenols? / S. Hercberg // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2005. – Vol. 81, № 1. – P. 218S–222S.
250. Степовая, Е.А. Структура и свойства липидного бислоя мембран эритроцитов у больных со злокачественными новообразованиями / Е.А. Степовая, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцев, В.Е. Гольдберг и др. // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.* – 2003. – Т. 136, № 11. – С. 553–557.

251. Fatkullina, L. Radioprotective effect of antioxidant phenozan on structural state of biomembranes exposed to low radiation doses: Abstr. / L. Fatkullina, A. Goloschapov, E. Burlakova // 35th Ann. Meet. Eur. Radiat. Res. – Kiev. – 2006. – P. 86–87.
252. Бурлакова, Е.Б. Изменения в составе жирных кислот мозга и печени мышей с увеличением возраста и при приеме эфирного масла чабера / Е.Б. Бурлакова, Т.А. Мишарина, Л.Д. Фаткуллина, М.Б. Теренина, Н.И. Крикунова, В.Н. Ерохин, А.К. Воробьева // Доклады РАН. – 2011. – Т.437, № 3. – С. 409–412.
253. Мишарина, Т.А. Изменения в составе жирных кислот мозга и печени с увеличением возраста мышей высококорактовой линии АКР и влияние приема эфирного масла чабера на лейкозный процесс / Т.А. Мишарина, Е.Б. Бурлакова, Л.Д. Фаткуллина, М.Б. Теренина, Н.И. Крикунова, А.К. Воробьева, В.Н. Ерохин, А.Н. Голощапов // Биомед. химия. – 2011. – Т.57, № 6. – С.604–614.