

**Список литературы / References:**

1. Lassalle V., Ferreira M.L. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromol. Biosci.*, 2007, vol. 7, pp. 767-783.
2. Praetorius N.P., Mandal T.K. Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent patents on drug delivery & formulations*, 2007, vol. 1, pp. 37-51.
3. Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B; Biointerfaces*, 2010, vol. 75, pp. 1-18.
4. Hakkarainen M. Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. *Advances in polymer science*, 2002, vol. 157, pp. 113-134.
5. Makadia H.K., Siegel S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 2011, vol. 3, pp. 1377-1397.

**ЭКСПРЕССИЯ С-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ИХ ИММУНОГЕННОСТЬ В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ ТИ-КОМПЛЕКСОВ**

Иванов А.А.<sup>1</sup>, Кондратов И.Г.<sup>2</sup>, Люкманова Е.Н.<sup>3</sup>, Веремейчик Г.Н.<sup>4</sup>,  
Мазейка А.Н.<sup>1</sup>, Цыбульский А.В.<sup>1</sup>, Костецкий Э.Я.<sup>1</sup>, Санина Н.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет  
ул. Суханова, 8, г. Владивосток, 690950, РФ  
e-mail: sentado\_333@mail.ru

<sup>2</sup>Лимнологический институт СО РАН  
ул. Улан-Баторская, 3, г. Иркутск, 664033, РФ

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

<sup>4</sup>Биолого-почвенный институт ДВО РАН  
пр. 100-летия Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

**Аннотация.** С целью создания субъединичной вакцины против распространенного и смертельно опасного вирусного заболевания - клещевого энцефалита наиболее целесообразным представляется использование III домена белка E вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), включающего основные эпитопы нейтрализации вируса, и прилегающей к нему С-концевой цепочки белка E, состоящей из ножки и гидрофобного якоря, необходимого для инкорпорирования белка в созданный нами адьювантный наноноситель антигенов - тубулярный иммуностимулирующий комплекс (ТИ-комплекс). Для получения двух фрагментов белка E: III домена и III домена с ножкой и гидрофобным якорем была использована экспрессионная система *Escherichia coli* и бесклеточная система. Показано, что гидрофобный якорь, токсичный для бактерии, разрушается после синтеза в клетке. Однако в бесклеточной среде фрагмент белка E с гидрофобным якорем был успешно экспрессирован. Иммунизация мышей полученными антигенами как в составе ТИ-комплексов, так и без них показала отсутствие иммуногенности III домена, тогда как III домен с ножкой и гидрофобным якорем в 2 раза эффективнее стимулировал выработку антител по сравнению с контролем. Инкорпорирование этого рекомбинантного белка в ТИ-комплексы приводило к дальнейшему повышению иммуногенности антигена в 1.5 раза. Полученные результаты будут использованы для поиска более эффективных форм С-концевого домена белка E для получения оптимальной вакцинной конструкции на основе ТИ-комплексов.

**Ключевые слова:** экспрессионные системы, субъединичные белки, адьювантный наноноситель антигена.

**EXPRESSION OF C-TERMINAL FRAGMENTS OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS E PROTEIN AND ITS IMMUNOGENICITY IN THE CONTENT OF NANOPARTICULATE TI-COMPLEX**

Ivanov A.A.<sup>1</sup>, Kondratov I.G.<sup>2</sup>, Lukmanova E.N.<sup>3</sup>, Veremeichik G.N.<sup>4</sup>,  
Mazeika A.N.<sup>1</sup>, Tsybulsky A.V.<sup>1</sup>, Kostetsky E.Y.<sup>1</sup>, Sanina N.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Far Eastern Federal University  
Sukhanov str., 8, Vladivostok, 690950, Russia  
e-mail: sentado\_333@mail.ru

<sup>2</sup>Limnological Institute SB RAS  
Ulan-Batorskaya str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

<sup>3</sup>Institute of bioorganic chemistry RAS  
Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, 117997, Russia

<sup>4</sup>Institute of Biology and Soil Science FEB RAS  
100 let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia

**Abstract.** In order to create subunit vaccine against widespread and deadly viral disease - encephalitis, most feasible is the use of domain III of the tick-borne encephalitis virus (TBE) E protein, which includes the main virus neutralizing epitopes, as well as the adjacent C-terminal polypeptide chain, consisting of the stem and a hydrophobic anchor required for incorporation of the protein into the adjuvant nanocarrier of antigens – tubular immunostimulating complex (TI-complex) elaborated by us. It was used expression system of *Escherichia coli* and the cell-free expression

system to obtain two fragments of E protein: domain III and domain III with the stem and the hydrophobic anchor. It was shown that hydrophobic anchor, which is toxic for bacteria, is destroyed after synthesis in the cell. However, part of E protein with hydrophobic anchor was successfully expressed in cell-free system. Immunization of mice by received antigens in the content of TI-complexes and without them showed no immunogenicity of domain III, while domain III with the stem and the anchor stimulated the production of antibodies by 2 times more effectively compared with the control. The incorporation of this recombinant protein in TI-complex resulted in further enhance of the antigen immunogenicity by 1.5 times. The results will be used to search for more effective forms of the C-terminal domain of E protein for optimal vaccine construction based on TI-complexes.

**Key words:** expression systems, subunit proteins, adjuvant nanocarrier of antigen.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – один из наиболее распространенных в России и мире вирусов, опасных для жизни человека [1]. Существующие вакцины против ВКЭ имеют два основных недостатка: многократность иммунизации для достижения кратковременного устойчивого иммунитета и опасность развития клинической стадии энцефалита при неполной инаktivации вируса в вакцине и/или слабом иммунитете пациента. В отличие от существующих коммерческих вакцин субъединичная вакцина не содержит вирусного генетического материала, что полностью исключает возможность побочных эффектов. Однако, иммуногенность одиночного белка вируса намного меньше, чем целого вириона. Поэтому для создания эффективной субъединичной вакцины необходимы адъюванты, усиливающие иммуногенность белкового антигена. С этой целью нами были разработаны высокоэффективные адъювантные наноносители антигенов – тубулярные иммуностимулирующие комплексы (ТИ-комплексы), состоящие из тритерпенового гликозида кукумариозида А2-2, выделенного из голотурии *Cucumaria japonica*, холестерина и моногалактозилдиацилглицерина (МГДГ), выделенного из морских макрофитов [2]. На примере порина из *Yersinia pseudotuberculosis* (YOmpF) [3] и человеческого сывороточного альбумина [4] было показано, что ТИ-комплексы могут быть использованы не только для амфифильных антигенов как адъювантный носитель, но и для водорастворимых антигенов в качестве адъюванта.

Гликопротеин E является наиболее важным поверхностным белком ВКЭ. Он ответственен за проникновение вируса в клетку и содержит множество последовательностей, которые являются консервативными для разных флавивирусов. Гликопротеин E располагается на поверхности вирусной частицы в димерной форме. Каждый мономер белка имеет 3 домена, ножку и гидрофобный якорь для удержания молекулы в липидном бислое вириона [5]. Наиболее важные и конформационно устойчивые эпитопы белка E располагаются в домене III и в ножке [6]. Целью настоящей работы было получение III домена и III домена с ножкой и гидрофобным якорем, используя клеточную и бесклеточную экспрессионные системы, а также тестирование иммуногенности полученных антигенов индивидуально и в составе ТИ-комплексов.

Для приготовления плазмид для клеточного синтеза обеих конструкций антигена был взят вектор pET-22b+ (Novagen, США), обработанный рестриктазами NdeI and XhoI (Fermentas, Литва). В качестве матрицы целевых генов была использована кДНК ВКЭ штамма Софьин. ПЦР проводили в стандартном температурном режиме (95 °C – старт, 94 °C – денатурация, 55 °C – отжиг праймеров, 72 °C – элонгация). Векторы и вставки были соединены с помощью T4 лигазы (Fermentas) и затем выделены из агарозного геля после гель-электрофореза. Обе плазмиды (с геном III домена белка E и геном III домена белка E с ножкой и якорем) были клонированы в *E. coli*, штамм XL-1 blue (Bioscience, USA) посредством трансформации клеток в хлоридом кальция и затем выделены из клеточной культуры щелочным методом.

Трансформацию клеток *Escherichia coli* штамма BL 21 (DE3) (New England Biolabs, США) проводили выделенными, как описано выше, плазмидами. Синтез III домена белка E (см. рис. 1) был индуцирован добавлением в клеточную культуру изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Лизис клеток достигался обработкой в ультразвуковой бане, чередующейся с заморозками и оттаиваниями, добавлением 20 % Triton X100. Для оценки присутствия растворимой формы белка клеточный лизат центрифугировали 30 мин при 8000 g, после чего пробы из супернатанта использовали для ПААГ электрофореза. К одной части супернатанта добавляли буфер для внесения в гель без ДТГ, не подвергая термической обработке, для обнаружения в образце растворимых мономерных молекул белка. Вторая часть супернатанта была подготовлена классически, по Лэмбли. Тельца включений, оставшиеся после центрифугирования на дне пробирки, промывали несколько раз раствором 1x фосфатно-солевого буфера (PBS). Растворение белка достигалось с помощью 6 М гидрохлорида гуанидина и 8 М мочевины с последующим очищением белка методом аффинной хроматографии на колонке с никелевой агарозой (Qiagen, USA). Растворенный белок диализовали ступенчато против 1x PBS с 4 mM мочевины, а затем с помощью 2 mM мочевины, и, наконец, против чистого 1x PBS.

Для приготовления плазмиды для бесклеточного синтеза конструкция, содержащая ген III домена белка E с ножкой и гидрофобным якорем, была собрана, используя коммерческий вектор pIVEX 2.3d (5 Prime GmbH., Германия). Вектор и вставка перед лигированием были обработаны рестриктазами NcoI и SmaI (Fermentas), клонированы и выделены аналогично вышеописанному.

Для получения III домена белка E с ножкой и якорем использовали модифицированную версию описанного ранее метода экспрессии белков в бесклеточной системе [7]. Бактериальный экстракт S30 был получен из *E. coli* (штамм A19). Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 100 mM HEPES-KOH (Sigma, США), pH 8.0, 2 % ПЭГ 8000 (Sigma), 1 mM каждой аминокислоты: Арг, Цис, Трп, Мет, Асп и Глу

(Sigma), 2 mM 1,4-дителиотреитола (Sigma), 0.15 мг/мл фолиевой кислоты (Sigma), 23 mM ацетил фосфата (Sigma), 23 mM фосфоенолпирувата (Sigma), 1.4 mM АТФ (Sigma), 1 mM ГТФ, ЦТФ и УТФ (Sigma), 90 mM КОАс (Sigma), 10 mM Mg (OAc) 2 (Sigma), по 1.3 mM остальных аминокислот (Sigma), 0.05 % NaN<sub>3</sub> (Sigma), 1.5 mM спермидина (Thermo Fisher Scientific, США), 1 таблетку на 10 мл полного ингибитора протеазы (Roche Diagnostics, Германия), 0.3 ед./мкл RiboLock (Fermentas), 0.04 мг/мл пируваткиназы (Fermentas), 0.0055 мг/мл РНК-полимеразы T7, 0.5 мг/мл т-РНК из *E.coli* MRE 600 (Roche Diagnostics), 0.4 мг / мл плазмиды pIVEX 2.3d (только в препаративных реакциях), 30 % экстракт S30 из *E. coli*. Питающая смесь содержала те же компоненты, за исключением высокомолекулярных веществ, то есть S30 экстракта, ферментов, ингибиторов рибонуклеаз, плазмид. Отношение объемов реакционной смеси к питающей смеси - 1/15. Препаративный бесклеточный синтез проводили с использованием мембранной трубки с порами 12 kDa (Sigma) при температуре 30 °C с аккуратным перемешиванием в течение 20 ч. После окончания синтеза белок отмывали от компонентов реакционной смеси буфером «А» [7], растворяли в 1 %-ном лаурил саркозинате натрия и затем инкубировали с Ni-сефарозой 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания). Суспензию помещали в MicroSpin Column (Thermo Fisher Scientific, США) и центрифугировали 15 с при 0.2 krpm в центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). Перед каждым центрифугированием смолу обрабатывали тремя колоночными объемами буфера «А» с 10 mM имидазола, тремя объемами буфера с 100 mM имидазола, одним объемом буфера с 100 mM имидазола, тремя объемами буфера с 500 mM имидазола, одним объемом буфера с 500 mM имидазола. Соответственно образцы приготавливали и анализировали с помощью ПААГ электрофореза.

ТИ-комплексы получали, как описано [8]. Иммунизацию мышей и иммуноферментный анализ содержания антител в сыворотке крови животных проводили, как описано [2].

Были получены генетические конструкции обоих белков. Идентичность нуклеотидной последовательности целевого гена в плазмиде была сверена с генетической последовательностью штамма Софьин (GenBank номер: AB062064.1) с помощью капиллярного секвенатора ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Плазмиды были выделены с помощью классического электрофореза в агарозном геле. Была получена библиотека клонов *E. coli*, содержащих рабочие плазмиды. III домен белка E был получен в тельцах включения кишечной палочки. Повторные синтезы белка с некоторым изменением условий культивирования не приводило к его продукции в растворимой форме. III домен белка E с ножкой и гидрофобным якорем удалось экспрессировать в *E. coli* (штамм BL 21 (DE3)), но не удалось наладить стабильную индукцию синтеза этого белка. Было обнаружено, что гидрофобный якорь на С-конце белка E токсичен для клеток *E. coli*.

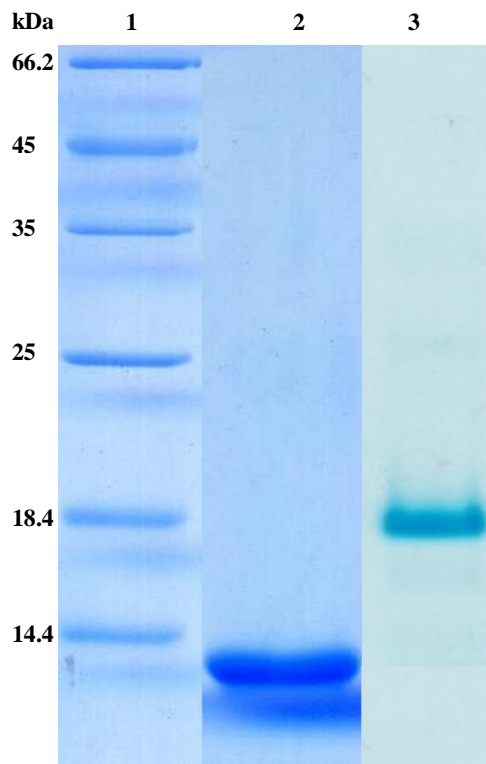


Рисунок 1 – Электрофореграммы (в 12% Трис-глициновом ПААГ) III домена белка E, экспрессированного в клеточной системе, и III домена белка E с ножкой и гидрофобным якорем, экспрессированного в бесклеточной системе. 1 – маркер молекулярного веса, 2 – очищенный III домен белка E в элюате с 100 mM имидазола, 3 – очищенный III домен белка E с ножкой и гидрофобным якорем в элюате с 100 mM имидазола

III домен белка E с ножкой и гидрофобным якорем (см. рис. 1) был получен в бесклеточной экспрессионной системе. В первых реакциях плазмиды была взята в следующих концентрациях: 0.30, 0.61, 1.22 и 2.44 мг/мл. Было установлено, что концентрация 0.4 мг/мл плазмиды pET22b+ с целевым геном в

реакционной смеси является оптимальной. Белок был синтезирован в виде осадка, так как гидрофобный якорь препятствует растворению белка в водной среде. Осадок отмывали от компонентов реакционной смеси буфером «А», а затем растворяли в 1 %-ном растворе додецилсульфата натрия (SDS). Попытка очистки белка не удалась, так как он не взаимодействовал со смолой. После повторного синтеза одна часть промытого осадка белка была растворена в буфере «А» с 1 % лаурил саркозината натрия (ЛСН), вторую часть растворяли в том же буфере с 1 % додецилфосфохолина (DPC). Очищенный белок, растворенный в 1 % DPC, сильно взаимодействует с сорбентом, что снижает возможность его элюции в чистом виде. Однако белок, растворенный в 1% ЛСН хорошо элюировался с сорбента при концентрации имидазола в элюирующем растворе 100 мМ. Были сделаны попытки синтезировать белок с наличием в реакционной смеси детергентов: Brij 35, Brij 58, Brij 78, Brij 98, n-октил-β-D-глюкопиранозид, тритон X-100, n-додецил-β-D-мальтопиранозид (DDM) в концентрациях 0.2 % и 0.5 %. Показано, что синтез белка в нерастворимой форме уменьшается, в то время как синтез белка в растворенном виде остается очень низким. Brij 98 дал максимальный выход растворимого белка, однако общее количество синтезированного белка было намного меньше, чем при синтезе без детергентов. Для увеличения выхода белка целевой ген белка вставляли в плазмиду pIVEX 2.3d и переносили его полигистидиновый таг с С-конца на N-конец белка. Затем проводили окончательный синтез белка с использованием плазмиды в концентрации 0.6 мг/мл. Полученный белок был очищен (см. рис. 1), освобожден от детергента путем осаждения белка в 10 %-ной трихлоруксусной кислоте и ацетоне.

Для оценки иммуногенных свойств III домен белка E был смешан с суспензией ТИ-комплексов. Центрифугирование, проведенное после обработки образца ультразвуком, показало, что белок не вошел в ТИ-комплекс. Для иммунизации мышей использовали две дозы: 5 и 10 мг индивидуального белка E (III домен) или того же белка в смеси с ТИ-комплексами. Анализ результатов иммунизации мышей индивидуальным белком (III домен белка E) или в смеси с ТИ-комплексами не выявил различий между уровнями антител в экспериментальных группах животных по сравнению с контролем. Отсутствие иммунного ответа на III домен белка E, вероятно, связано с низкой молекулярным весом белка.

Подготовка второго белка в клеточной системе, вызвало несколько проблем. Во-первых, индукция синтеза белка была очень неустойчива и всегда меньше, по сравнению с индукцией белка без гидрофобной области. Несмотря на нестабильность синтеза, были сделаны некоторые успешные попытки. Однако выделить белок из лизата клеточной культуры не удалось. Мы пришли к выводу, что гистидиновая последовательность на С-конце белка экранировалась гидрофобными якорями соседних молекул и оказывалась недоступной для сорбента.

III домен белка E с ножкой и гидрофобным якорем более интересен как потенциальный антиген для инкорпорирования в липидный матрикс ТИ-комплексов, функцию которого выполняет гликолипид МГДГ из морских макрофитов. Бесклеточная система позволяет получать этот белок без рисков его деградации, которые могут возникнуть при его синтезе в живой бактерии. Однако, не ясно, почему при добавлении различных детергентов выход белка при бесклеточном синтезе снижался, хотя при синтезе других мембранных белков с помощью этого метода подобных проблем не возникало [9]. Также неожиданным было то, что белок в присутствии додецилсульфата натрия не мог взаимодействовать с аффинным сорбентом. Перенос гистидиновой последовательности на N-конец молекулы позволил преодолеть трудности, возникшие при очистке белка, что подтверждает наше предположение об экранировании гистидинового тага, расположенного на С-конце молекулы.

Наиболее эффективным детергентом для растворения и очистки III домена белка E с ножкой и якорем оказался лаурил саркозинат натрия. В отличие от III домена белка E, который не проявил иммуногенности, III домен белка E с ножкой и якорем в 2 раза более эффективно стимулировал продукцию антител по сравнению с контролем. Инкорпорирование белка в ТИ-комплексы приводило к дальнейшему повышению уровня антител в 1.5 раза.

Полученные результаты будут использованы для поиска более эффективных форм С-концевого домена белка E для получения оптимальной вакцинной конструкции на основе ТИ-комплексов.

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант 15-15-00035*

*This work was supported by Russian Science Foundation Grant 15-15-00035*

#### **Список литературы / References:**

1. Kovalev S.Y., Kokorev V.S., Belyaeva I.V. Distribution of Far-Eastern tick-borne encephalitis virus subtype strains in the former Soviet Union. *J. Gen. Virol.*, 2010, vol. 91, pp. 2941-2946.
2. Санина Н.М., Попов А.М., Ли И.А., Костецкий Э.Я., Цыбульский А.В., Шныров В.Л. *Способ получения носителя антигенов на основе липидов из морских макрофитов и тритерпенового гликозида кукумариозида*. Патент РФ 2319506. Приоритет - 12 октября 2005. [Sanina N.M., Popov A.M., Lee I.A., Kostetsky E.Y., Tsybulsky A.V., Shnyrov V.L. *Mode of forming of antigen carrier based on lipids from marine macrophytes and triterpene glycoside cucumarioside*. Patent of Russian Federation 2319506. Priority - October 12, 2005. (In Russ.)]
3. Sanina N.M., Kostetsky E.Y., Shnyrov V.L., Tsybulsky A.V., Novikova O.D., Portniagina O.Y., Vorobieva N.S., Mazeika A.N., Bogdanov M.V. The influence of monogalactosyldiacylglycerols from different marine macrophytes on immunogenicity and conformation of protein antigen of tubular immunostimulating complex. *Biochimie*, 2012, vol. 94, pp. 1048-1056.

4. Vorobyeva N.S., Mazeika A.N., Davydova L.A., Velansky P.V., Tsybulsky A.V., Kostetsky E.Y., Sanina N.M. The effects of triterpene glycosides and phospholipids from marine invertebrates in the composition of tubular immunostimulating complexes on the immunogenicity of human serum albumin. *Russian Journal of Marine Biology*, 2015, vol. 41, pp. 69-77.

5. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunzt C., Harrison S.C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. *Nature*, 1995, vol. 375, pp. 291-298.

6. Kiermayr S., Stiasny K., Heinz F.X. Impact of quaternary organization on the antigenic structure of the tick-borne encephalitis virus envelope glycoprotein E. *J. Virol.*, 2009, vol. 83, pp. 8482-8491.

7. Schneider B., Junge F., Shirokov V.A., Durst F., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F. Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol. Biol.*, 2010, vol. 601, pp. 165-186.

8. Kostetsky E.Y., Sanina N.M., Mazeika A.N., Tsybulsky A.V., Vorobyeva N.S., Shnyrov V.L. Tubular immunostimulating complex based on cucumarioside A2-2 and monogalactosyldiacylglycerol from marine macrophytes. *J. Nanobiotechnology*, 2011, vol. 9, no. 35.

9. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarov L.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. Lipid-protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, vol. 1818, pp. 349-358.

### АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ МЫШЕЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Фаткуллина ЛД., Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Бурлакова Е.Б.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119334, РФ

e-mail: bcp-lfat@mail.ru

**Аннотация.** В работе исследовали действие природных эфирных масел орегано, гвоздики или смеси эфирного масла лимона и экстракта имбиря на антиоксидантный статус органов интактных мышей. Найдено, что эфирные масла, принимаемые мышами в течение 6 месяцев даже в очень малых дозах (300 нг в сутки), проявили себя *in vivo* как эффективные биоантиоксиданты. Они снижали интенсивность перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов, а также в печени и мозге мышей. Эфирные масла 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 эфирного масла лимона и экстракта имбиря.

**Ключевые слова:** эфирные масла, биоантиоксиданты, перекисное окисление липидов, эритроциты, печень и мозг интактных мышей.

### ANTIOXIDANT STATUS OF ORGANS AND TISSUES OF MICE WITH THE EFFECTS OF LOW DOSE ESSENTIAL OILS

Fatkullina L.D., Misharina T.A., Alinkina E.S., Kozachenko A.I., Nagler L.G., Burlakova E.B.

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

ul. Kosygina, 4, Moscow, 119334, Russia

e-mail: bcp-lfat@mail.ru

**Abstract.** The effect of natural essential oils from oregano, clove bud, or mixture of lemon essential oil and ginger extract on antioxidant status of intact mice organs was studied. It was found that essential oils taken by the mice within 6 months, even in very small doses (300 ng per day), proved *in vivo* as an effective biologic antioxidants. They reduced the intensity of lipid peroxidation in membranes of erythrocytes as well as in liver and brain of mice. Essential oils increased the stability of the lipids of liver and brain and increased the activity of antioxidant enzymes of the liver. The most active bioantioxidant in erythrocytes was essential oil from clove bud, a mixture of lemon essential oil and ginger extract was more active in the liver and brain.

**Key words:** essential oils, bioantioxidants, lipid peroxidation, erythrocytes, liver and brain of intact mice.

Известно, что антиоксиданты (АО) являются универсальными модификаторами состава, структуры и функциональной активности мембран и многие закономерности их влияния на клеточный метаболизм могут быть объяснены с этих позиций. Существующие неблагоприятные факторы окружающей среды, развитие патологических процессов в организме приводят к нарушению отдельных звеньев этой отлаженной системы и к развитию окислительного стресса [1]. Для снижения и предотвращения его последствий используют дополнительные экзогенные АО, среди которых интересными и перспективными являются эфирные масла (ЭМ) пряно-ароматических растений, употребляемых в пищу [2].

Применение АО в биологических объектах требует проведения специальных исследований их роли и механизма действия. Изучение таких процессов является крайне сложной задачей. В настоящее время нет ни одного метода, позволяющего выявить реальный механизм действия даже индивидуального антиоксиданта в