



Effects of Essential Oils on Telomere Length in Human Cells

Plant J*

Zija International, Inc. 3300 Ashton Blvd, Lehi, UT 84043, USA

«Влияние эфирных масел на длину теломеров»

Обобщенный перевод научного исследования Plant J, Zija International, Inc. США, опубликованного в открытом доступе по ссылке <https://www.readcube.com/articles/10.4172/2167-0412.1000230>

Краткий релиз к исследованию:

Эфирные масла имеют уже много подтверждений положительного влияния на здоровье человека: борьба с воспалениями, инфекциями, вирусами, антиоксидантная активность. Однако еще не было подтвержденных научных данных о предполагаемом омолаживающем воздействии эфирных масел на организм.

Мы решили оценить влияние 31 эфирного масла на длину теломер, которые играют одну из ключевых ролей в клеточном старении.

Клетки подвергались воздействию выбранных эфирных масел в присутствии или в отсутствие перекиси водорода. Изменения в теломерах (их длину) измеряли с помощью анализа ПЦР.

Два эфирных масла из исследуемых, которые продемонстрировали теломерозащитное действие, были дополнительно исследованы с помощью цитогенетического анализа, окрашивания теломер.

Значительное влияние было замечено среди эфирных масел с в отношении их способности индуцировать очевидное изменение длины теломер и защищать теломеры от повреждения, вызванного перекисью.

Анализ показал, что масла, защищающие теломеры, не увеличивали активность теломеразы. Вывод: некоторые оказывают защитное действие на теломеры. Также зафиксирован эффект снижения теломер-супрессорного белка TEF-1.

Данное научное исследование можно считать основой, на которой в дальнейшем может строиться дальнейшее научное изучение омолаживающих свойств эфирных масел

Вступление

К эфирным маслам в настоящее время заметен повышенный интерес как со стороны общества, так и со стороны научных институтов, как к продуктам натурального происхождения, способных в некоторых случаях эффективно заменять синтетические препараты для здоровья. Эфирные масла представляют собой сложные смеси летучих природных соединений, выделенные из различных частей родительского растения (семена, лист, корень и т.д.). Анализы эфирных масел с помощью хроматографии и спектрометрии

показывают, что они могут содержать от 20 до 60 компонентов-молекул в совершенно разных концентрациях и составах. Как правило, они состоят из двух или три основных молекул с высокими концентрациями (в диапазоне 20-70% от общего числа), и нескольких второстепенных молекул, некоторые в следовых количествах. Молекулы обычно считаются ответственными за большую

часть наблюдаемых биологических эффектов. Действуя в одиночку и/или работая в согласовании с другими составляющими эфирного масла, однако, второстепенные молекулы, как было доказано, обладают важной биологической активностью.

Уже широко распространено мнение, что комбинированное действие всех компонентов эфирных масел, потенциально действуя синергетически, обеспечивает лучшую эффективность и пользу для здоровья, чем отдельно взятые молекулы данного эфирного масла.

Данные научных исследований свидетельствуют о том, что терапевтические эффекты эфирных масел возникают в основном как противомикробные, противораковые, антиоксидантные, антимутагенные, противовоспалительные и антиаллергические.

Одно утверждение, обычно рекламируемое сторонниками натуральных продуктов, что эфирные масла помогают бороться с последствиями старения (морщины, органная недостаточность, мышечная слабость, и так далее) еще не подтверждено научными данными.

Теломерная теория старения утверждает, что по мере того, как соматические клетки продолжают разделять жизнь организма, его теломеры (защитные последовательности на концах каждой хромосомы) постепенно укорачиваются. Это связано с неспособностью механизма репликации ДНК полностью реплицировать концы линейной хромосомной ДНК, так что небольшое количество последовательностей теряется с каждым раундом репликации, то есть во время каждого деления клетки.

После определенного количества клеточных делений (известного как «предел Хейфлика») теряется достаточное количество хромосомного материала, чтобы репликативный потенциал клетки оказался превышен, и она стареет.

Этот негативный эффект репликативного предела может быть преодолен за счет действия фермента теломеразы (РНК-комплекса, который позволяет копировать концы хромосом без потерь генетического материала). Например, стволовые клетки экспрессируют теломеразу и не ограничены этим репликативным пределом.

Активация теломеразы также является отличительной чертой рака, так как опухолевые клетки обладают безграничным репликативным потенциалом. Фермент теломеразы, однако, не действует в одиночку - несколько белков либо взаимодействуют с теломеразой, либо тем или иным образом регулируют ее действие. Один такой белок, TERC-1 (также известный как TRF-1), представляет собой ДНК-связывающий белок со специфичностью к теломерной ДНК, которая ингибирует удлинение теломер за счет действия в цис-положении (блокировки и связывания теломеразы)

По мере того, как теломеры удлиняются из-за действия теломеразы, TERC-1 генерируются до тех пор, пока не будет достигнуто пороговое значение, в котором точечная теломераза больше не может действовать. По мере того, как теломеры со временем укорачиваются, этот порог больше не достигается, и теломераза снова способна связывать и удлинять концы хромосом, создавая равновесие. Таким образом, длина теломер сохраняется.

В то время как укорачивание теломер является одной из причин, от которой клетки стареют, считается, что это не единственная причина. Пролонгированный окислительный стресс, будь то воспаление или воздействие реактивного кислорода также влияет на старение клеток

Окислительный стресс имеет много биологических эффектов, например, он вызывает прямое повреждение ДНК за счет образования нескольких типов базовых повреждений строительных блоков ДНК. Если эти повреждения не устраняются или не могут быть устранены, то становятся постоянными и могут привести к мутациям, разрыву ДНК или гибели клеток. Если эти поражения

происходят в теломерных участках ДНК, укорачивание теломер происходит даже в присутствии теломеразы, так как фермент теломераза не может выполнять свою функцию при наличии поврежденных ДНК.

Настоящее исследование было предпринято для определения влияния популярных эфирных масел на теломеры при наличии и отсутствии окислительного стресса, чтобы получить научные данные, подтверждающие или опровергающие заявления о влиянии эфирных масел на процессы старения организма.

Материалы, используемые в данном исследовании:

31 эфирное масло:

1. мята перечная [*Mentha piperita*],
2. бергамот [*Citrus Bergama*],
3. грушанка [*Gaultheria procumbens*],
4. грейпфрут [*Citrus x parasisi*],
5. базилик [*Ocimum basilicum*],
6. розмарин [*Rosmarinus officinalis* CT *cineol*],
7. апельсин [*Citrus sinensis*],
8. мелалеука (чайное дерево) [*Melaleuca alternifolia*],
9. гвоздика [*Syzygium aromaticum*],
10. лимон [*Citrus limon*],
11. бальзамическая пихта [*Abies balsamea*],
12. береза [*Betula alba*],
13. ромашка [*Chamaemelum nobile*],
14. корица [*Cinnamomum verum*],
15. кипарис [*Cupressus sempervirens*],
16. эвкалипт шаровидный [*Eucalyptus globulus*],
17. эвкалипт *radiata* [*Eucalyptus radiata*],
18. ладан [*Boswellia carteri*],
19. имбирь [*Zingiber officinale*],
20. бессмертник [*Helichrysum italicum*],
21. лаванда [*Lavandula angustifolia*],
22. лемонграсс [*Cymbopogon flexuosus*],
23. майоран [*Origanum majorana*],
24. мирт [*Myrtus communis*],
25. орегано [*Origanum compactum*],
26. сандаловое дерево [*Santalum album*],
27. ель [*Picea mariani*],
28. мандарин [*Citrus reticulate*],
29. тимьян [*Thymus vulgaris*],
30. ветивер [*Vetiveria zizanioides*],
31. иланг-иланг [*Cananga odorata*]

Эфирные масла были получены через Améo, дочернюю компанию Zija International (Лехи, Юта, США). Эфирные масла были разведены в среде для культивирования клеток (см. ниже) перед применением к клеткам.

Культура клеток:

Клетки K562 (CCL-243, ATCC и Manassas, Вирджиния, США) выращивали в среде RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% раствора пенициллина/стрептомицина во влажном инкубаторе с 5% CO₂. Эта клеточная линия была выбрана на основании научного поиска, как имеющая теломеры достаточной длины (достаточно длинные для обнаружения динамики увеличения и уменьшения в ходе лабораторных исследований) для измерения последовательно в анализе на основе ПЦР, описанном ниже.

Клеточный материал посеян на 6×10^5 клеток на лунку (всего 2 мл, после добавления всех тестируемых агентов) в 6-луночных планшетах для тканевых культур для всех исследований.

Лечение тест-агентами:

Исходные растворы (0,1%) ЭМ готовили непосредственно перед обработкой клеток путем разбавления 1:1000 масла в ячейке с питательной средой. В обработанные лунки добавляли 100 мкл исходного раствора ЭМ для получения конечной концентрации 0,005%.

Стандартный контрольный водный раствор 50 мМ - антиоксидант (phenyl-alpha-TERT-butyl nitron, PBN).

Клетки подвергались испытанию агентов в течение 48 часов, после чего клетки центрифугировали в течение 5 минут при $500 \times g$ для удаления питательной среды и однократно промывали в PBS.

Полученный клеточный осадок сразу же использовали для последующего применения или хранили при -80°C до тех пор, пока они не потребуются (за исключением случаев анализа PNA-FISH, для чего клеточный осадок всегда использовали сразу после сбора).

Экстракция нуклеиновой кислоты

Извлечение и очистка геномной ДНК для определения длины теломер на основе ПЦР исследований, набор Quick-gDNA Miniprep Kit (Zymo Research, Inc., Ирвин, Калифорния, США) использовали в соответствии с инструкциями производителя.

Экстракцию РНК для последующей qRT-PCR проводили с использованием PureLink RNA Mini Kit (Thermo-Fisher Scientific, Grand Island, NY, США).

Анализ длины теломер на основе ПЦР

Процедура количественной ПЦР (кПЦР), описанная О'Каллаганом используется в качестве детерминанта длины теломер с использованием 2 лунок на образец ДНК, 4 лунки на группу лечения. кПЦР проводится с использованием быстрой системы ПЦР в реальном времени 7500 (Thermo-Fisher Scientific). Затем рассчитывают относительное содержание теломер как среднее отношение флуоресцентного сигнала в каждой группе лечения до флуоресцентного сигнала в необработанной группе

Измерение экспрессии генов

Тотальную РНК превращали в кДНК с использованием SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo-Fisher Scientific) и 1 мкг исходной РНК. Эту первую цепь кДНК использовали непосредственно в количественном обратном анализе и ПЦР (qRT-PCR) для human TERT (probe/primer set Hs00972650_m1, Thermo-Fisher Scientific) или TERC-1 ((probe/primer set Hs00819517_mH, Thermo-Fisher Scientific). GAPDH использовали в качестве контрольного образца (4326317E, Thermo-Fisher Scientific), как указано в руководстве по TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo-Fisher научный). ПЦР проводится с использованием 7500 Fast Real-Time PCR Системы (Thermo-Fisher Scientific).

Приготовление метафазного спреда и качественный PNA-FISH анализ теломер:

Для качественной проверки данных, полученных в результате анализа теломер на основе ПЦР, был использован зонд, специфичный для теломер; пептид-нуклеиновая кислота использована для флуоресцентной гибридизации *in situ* (PNA-FISH).

Набор Telomere PNA FISH Kit/FITC (Dako Inc., Карпинтерия, Калифорния, США) использовался в соответствии с инструкциями производителя, включая рекомендуемый протокол подготовки метафазного спреда с следующих исключений: клетки были синхронизированы с колцемидом в течение 19 часов, чтобы обеспечить достаточную популяцию метафазных ядер. Четыре этапа фиксации были выполнены для удаления всех следов цитоплазмы, а не три рекомендованных. ProLong Diamond Antifade Mountant с DAPI (Thermo-Fisher Scientific) использовался в качестве *antifade* реагента, и предметные стекла оставляли для отверждения в течение 24 часов.

Слайды визуализировали на флуоресцентной конфокальной оптике Nikon A1 микроскоп, настроенный на обнаружение FITC (пик возбуждения/испускания 490/525 нм) и DAPI (пик возбуждения/излучения 360/460 нм) в University of Utah HSC Cell Imaging Research Core.

Полученные результаты

1. Влияние эфирных масел на длину теломер:

Из протестированных образцов эфирных масел 31 растения

Результаты этого исследования представлены графически на рис1.

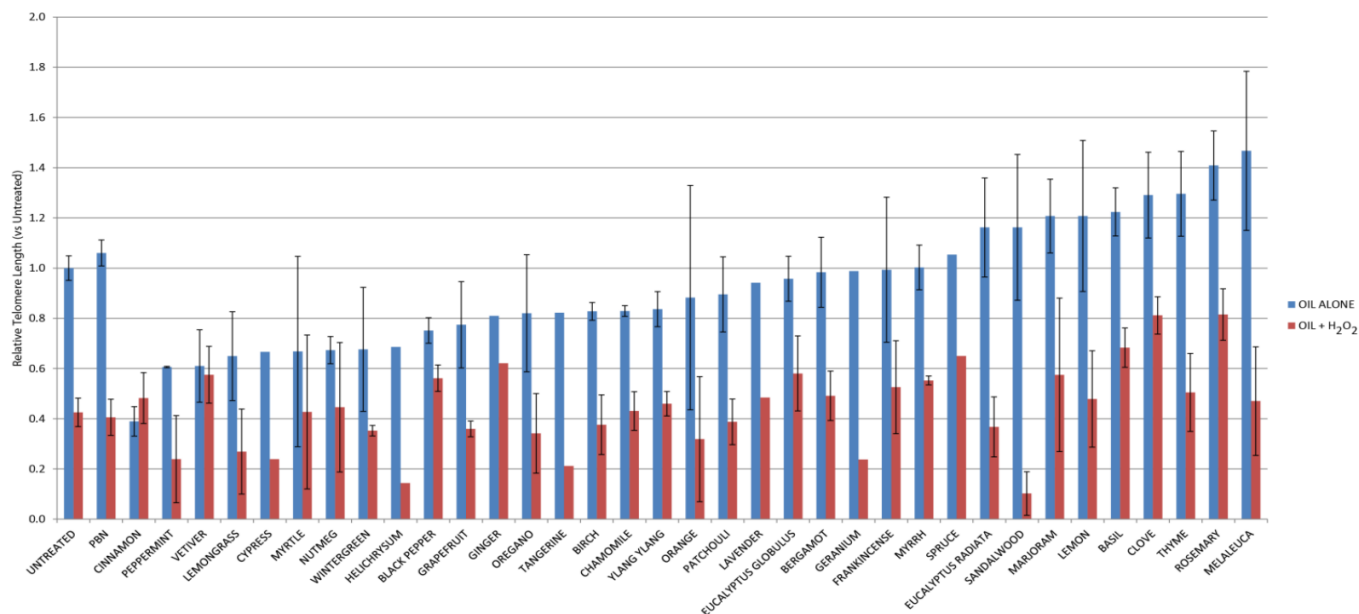


Рис1. Влияние 31 эфирного масла на длину теломер. Клетки K562 подвергали воздействию 0,005% эфирного масла с 0,2 мМ перекиси водорода или без нее в течение 48 часов и подвергают анализу длины теломер на основе ПЦР. Данные представлены нормализованными для необработанных контролей со стандартной ошибкой.

Столбики погрешностей представляют собой стандартную ошибку в серии повторных исследований, выполненных в течение нескольких дней. Уровень погрешности доходит до 40%. Это может быть связано с прямым окислительным повреждением ДНК или неправильной репарации пероксид-опосредованных поражений.

Интересно отметить, что некоторые эфирные масла вызывают явное увеличение длины теломер в необработанных клетках, при введении отдельно. Во многих случаях, и особенно после применения масел базилика, гвоздики или розмарина, эффект применения перекиси водорода, укорачивающий теломеры, уменьшается после обработки составов эфирными маслами, что приводит к росту теломер на 60-80% от размера теломер в необработанных контрольных клетках.

Эти данные побудили нас проверить действие этих масел на защиту теломер в дополнительных анализах.

Было проведено параллельное исследование.

1. Выбраны 2 эфирных масла, показавших наибольший эффект прироста длины теломер в первом исследовании. Это эфирные масла:

- базилик [*Ocimum basilicum*],
- розмарин [*Rosmarinus officinalis* CT *cineol*],

В новом дополнительном исследовании был использован флуоресцентный теломер-специфический пептидный зонд нуклеиновой кислоты, который связывается с последовательностями теломерной ДНК. Метафазные хромосомы были извлечены из клеток, обработанных этими эфирными маслами и визуализированы с помощью DAPI, общего окрашивания ДНК. Результаты этого анализа показаны на рисунке 2.

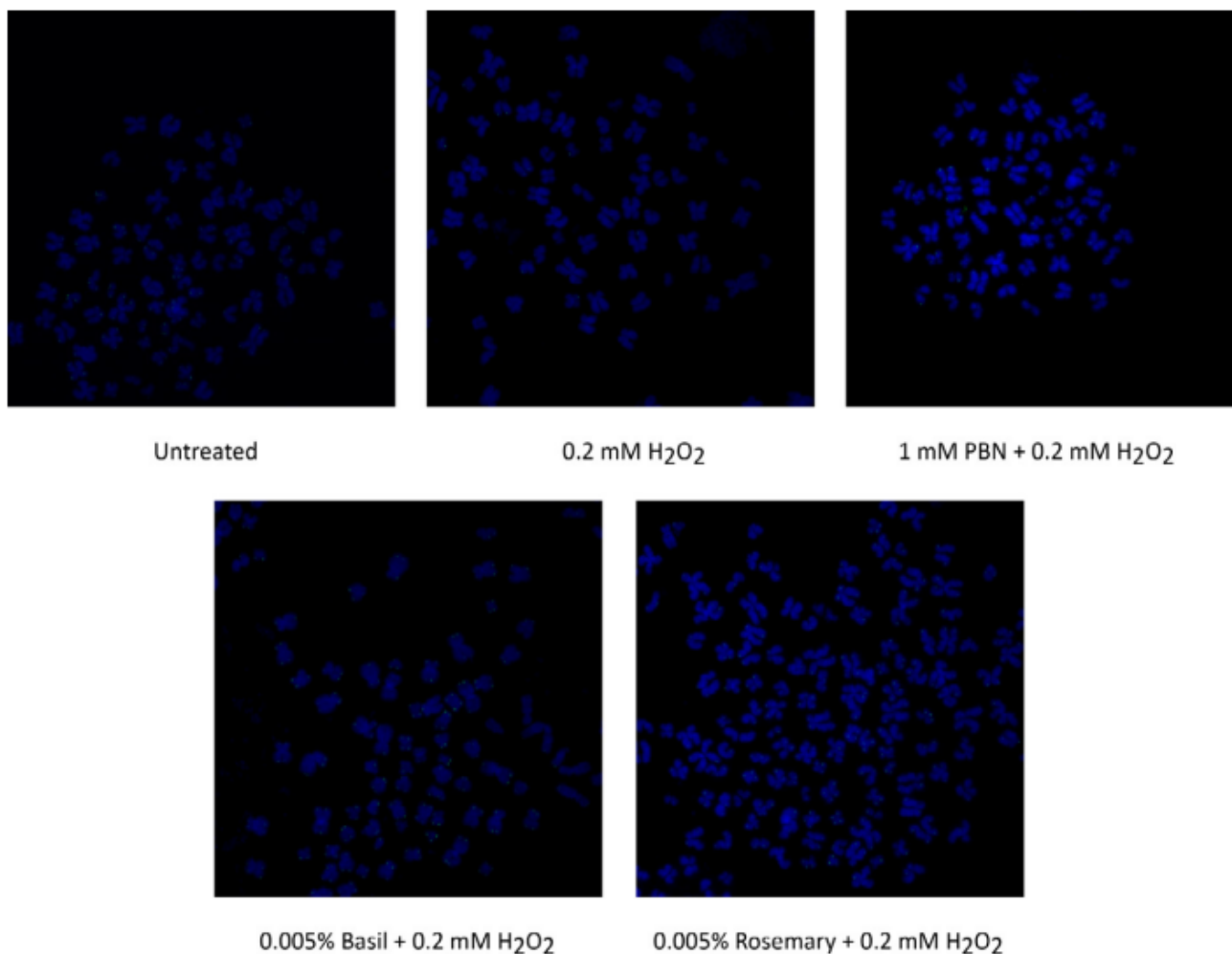


Рис.2. Пептидная нуклеиновая кислота-флуоресцентная гибридизация in situ (PNA-FISH) для теломерной ДНК.

Хотя эти данные не были количественными, очевидно, что после обработки перекисью водорода специфичный для теломер сигнал намного уменьшился. В присутствии антиоксиданта или одного

из двух эфирных масел, этот сигнал восстанавливается. Это подтверждает более раннее количественное результаты и предполагают, что влияние этих масел на теломеры, действительно, не разовое, но повторяющееся явление.

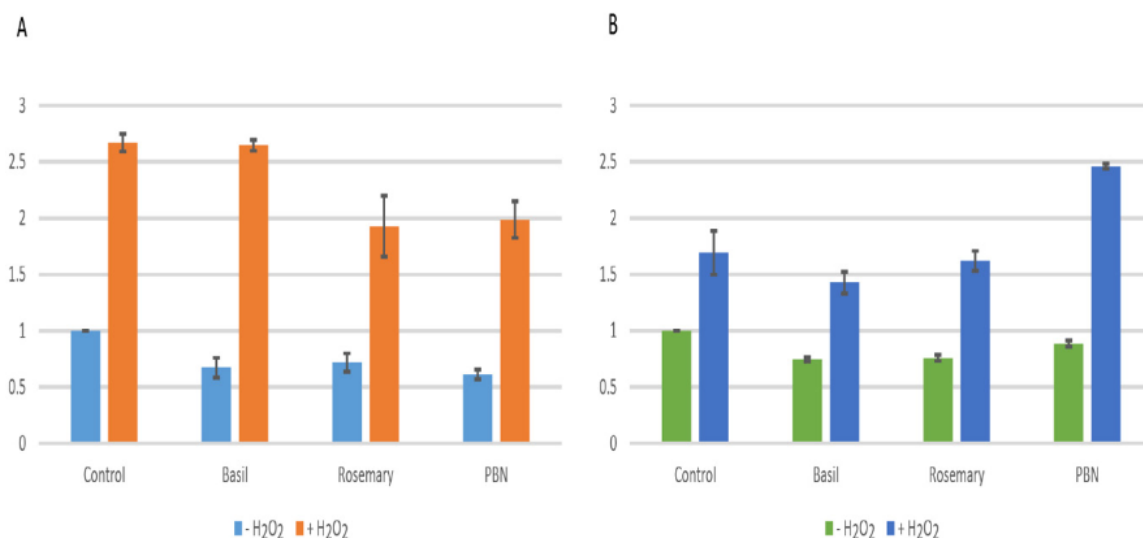


Рис.3 Влияние эфирных масел на экспрессию белков, связанных с теломерами.

Влияние эфирных масел на теломеразу и регуляцию теломеразы

На длину теломер влияет изменение экспрессии теломеразы. Была проведена qRT-PCR с человеческим геном TERT в качестве цели. Клетки снова обрабатывали эфирными маслами - либо базиликом, либо розмарином в присутствии или в отсутствие перекиси водорода, при тех же условиях, как при анализе длины теломер, описанном выше.

Результаты показаны на **рисунке 3А**. Уровни TERT уменьшились после обработки этими эфирными маслами и увеличилось после воздействия перекиси водорода. Похоже, что эфирные масла смягчают влияние перекиси на TERT в некоторой степени. Предполагаем, что это изменение в экспрессии генов связано с окислительным стрессом. Хотя это не подтверждает данные, увиденные ранее, это возможно, не должно быть сюрпризом; Клетки K562 иммортализованы, известно, что они экспрессируют фермент теломеразу.

Ген TERT частично контролируется окислительным стрессом и считается что играет защитную роль, не связанную с поддержанием длины теломер в отличие от АФК, которые вызывают увеличение экспрессии гена TERT. Когда клетка встречает антиоксидантоподобные молекулы, такие как эти эфирные масла или PBN, этот эффект может быть уменьшен или обращен вспять, что объясняет данные, которые мы получили. Экспрессия гена TERT увеличивается под действием пероксида без последующего удлинения теломер, так как, вероятно, в этих клетках присутствует теломераза в достаточно больших количествах, чтобы дополнительные компоненты не оказали влияния на длину теломер. Наблюдаемое укорачивание теломер может быть связано с окислительным повреждением или другим, не учтенным нами механизмом. Следует отметить тот факт, что некоторые ЭМ были показаны в независимые исследования по активизации членов транскрипции AP-1 факторного комплекса. Известно, что сверхэкспрессия AP-1 отрицательно регулируют TERT, предполагая еще один механизм, с помощью которого эти ЭМ могут подавлять экспрессию теломеразы.

Также изучалась реакция гена TERC-1 (негативный регулятор длины теломер) на ЭМ и окислительный стресс. Используя ту же кДНК, синтезированную в вышеприведенном анализе TERC, количественный ПЦР был выполнен для TERC-1, и данные экспрессии представлены **на рисунке 3В**.

В этом случае наблюдался эффект, аналогичный эффекту TERC: - снижение экспрессии TERC-1 в результате применения ЭМ розмарина и базилика и увеличение экспрессии после окислительного стресса. Механизм, что опосредует этот эффект, в настоящее время неясен, но; известно, что TERC-1 взаимодействует с KEAP-1, белком, участвующим в окислительном ответе на стресс. Однако как это взаимодействие TERC-1/KEAP-1 связано с окислительным стрессом пока неизвестно.

Независимо от механизма действия эффект этих двух эфирных масел на экспрессию TERC-1 может частично объяснить результаты наших более ранних анализов длины теломер:

- ЭМ уменьшают количество TERC-1, доступное для связывания с теломерами, что возвращает равновесие в пользу теломеразы и удлинения теломер. Сходным образом, активация TERC-1 при обработке пероксидом может сдвинуть равновесие в другую сторону и привести к укорочению теломер.

Хотя эти результаты потенциально связаны с окислительным повреждением (и защита от окислительного повреждения с помощью применения ЭМ), интересно отметить, что PBN, известный антиоксидант, не снижает активацию TERC-1 перекисью водорода, когда присутствуют как PBN, так и пероксид. Экспрессия TERC-1 выше, чем в клетках, обработанных только пероксидом.

Это говорит о том, что влияние эфирных масел на длину теломер может быть не связано исключительно с их известными антиоксидантными свойствами.

Обсуждение

Насколько нам известно, было проведено очень мало контролируемых научных исследований о связях эфирных масел с воздействием на теломеры. Основываясь на поиске записей на сервисе PubMed, мы нашли только анекдотические и неподтвержденные утверждения о том, что эфирные масла влияют на теломеразу или длину теломер.

Единственное научное исследование, проведенное группой в Китае, показало, что ЭМ сосновой хвои показал эффективное подавление экспрессии теломеразы в гепатоцеллюлярной (печеночной) группе опухолевых клеток, что подтверждает и представленные нами здесь данные, но доказательства в остальном скудны и часто не дотягивают до уровня экспертной оценки.

В своем исследовании мы впервые продемонстрировали влияние 31 эфирного масла на длину теломер и обнаружили существенные различия между ними:

- некоторые, такие как корица и перечная мята, по-видимому, отрицательно влияют на длину теломер, хотя они несут несомненную пользу для здоровья в других случаях.
- эфирные масла базилика, розмарина и некоторых других приводят к удлинению теломер и, по-видимому, защищают клетки против потери теломерной ДНК, вызванной окислительным стрессом.

Пока это может быть частично связано с антиоксидантными свойствами этих масел, непосредственно поглощающих АФК. Но представленные нами данные свидетельствуют о том, что действуют и другие факторы.

В то время как эти защищающие теломеры эфирные масла действительно не индуцируют продукцию теломеразы (экспрессия гена TERC ингибируется после обработки этими эфирными маслами), регулирующий теломеры белок TERC-1 подавляется, а это может быть частично ответственно за наблюдаемое увеличение длины теломер.

Эти собранные нами научные доказательства раскрывают новый механизм действия некоторых эфирных масел, который не был известен до этого. Кроме того, это говорит о том, что эти эфирные масла могут поддерживать длину теломер без увеличения теломеразы.

Поскольку активация теломеразы является одним из «признаков рака», ряда изменений, которые должны произойти, чтобы здоровая клетка трансформировалась и стала онкогенной, это открытие предполагает, что с клеточным старением можно бороться с помощью системного, долгосрочного применения эфирных масел без увеличения риска рака.

Описанная здесь работа ни в коем случае не является исчерпывающей: механизм, посредством которого TERT и TERC-1 аннулируются этими удлиняющими теломеры ЭМ, еще не изучен, и могут быть другие факторы, вносящие вклад в этот эффект, который мы не выяснили в этом исследовании.

Эта работа представляет собой основу для понимания роли, которую эфирное масло может играть роль в модуляции теломер и реверсировании старения. И мы надеемся, что исследования в этом направлении будут продолжены. Ясно, что эти эффекты не являются общими для всех эфирных масел, что указывает на необходимость обращать внимание на желаемый результат при выборе эфирного масла (или комбинации масел) для применения в биологически-активных добавках и других натуральных нутрицевтических продуктах для здоровья.

Выводы

Мы доказали, что некоторые эфирные масла, в том числе масла базилика (*Ocimum basilicum*) и розмарина (*Rosmarinus officinalis* СТ цинеол) способны увеличивать видимую длину теломер в клетке культуры при введении в низких (субтоксических) дозах. Этот эффект был продемонстрирован с использованием ранее описанной длины теломер на основе ПЦР анализа и подтвержден качественным цитогенетическим анализом. Анализ экспрессии генов показал, что эти масла не вызывали сопутствующего повышения в экспрессии hTERT гена.

Мы пришли к выводу, что эфирные масла могут иметь потенциал в использовании в качестве добавки для воздействия на клеточное старение, как только этот механизм будет полностью выяснен дополнительными научными исследованиями.

Декларация интересов:

Конкретные эфирные масла, использованные в этом исследовании, были получены от Améo, дочерняя компания Zija International, сотрудником которой является автор.

Данные представленные здесь, были собраны как часть характеристики этой компании для портфолио продуктов и публикуются здесь в надежде, что более широкое сообщество получит пользу от их распространения.

Wasatch Scientific Services получила оплату за их услуги лаборатории и подготовку материалов, но никаким иным образом не связаны с Zija International или ее дочерними компаниями.