

УДК (615.32: 582.477): 616.428

**ВЛИЯНИЕ ОТВАРА МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ТУРКМЕНСКОГО (JUNIPERUS TURCOMANICA B. FEDTCH.) НА ЭКСПРЕССИЮ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ НЕКОТОРЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ IN VITRO**

<sup>1</sup>Плескановская С.А., <sup>1</sup>Тачмухаммедова А.Х., <sup>2</sup>Дурдыева О.С.

<sup>1</sup>Государственный медицинский университет Туркменистана, Ашхабад,  
e-mail: pleskanovskaya\_s@mail.ru;

<sup>2</sup>Международный диагностический центр, Ашхабад

При исследовании характера влияния 5% отвара можжевельника туркменского (МТ) (*Juniperus turcomanica* B. Fedtch.) на субпопуляции лимфоцитов венозной крови практически здоровых лиц (ПЗЛ) *in vitro* установлено, что уже через 5 минут инкубации в присутствии фитопрепарата повышается численность лимфоцитов фенотипов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, NK и T-NK ( $p < 0,05$ ; 0,001; 0,05 и 0,05 соответственно). Практически не изменяется численность CD8<sup>+</sup> – и CD19<sup>+</sup> – лимфоцитов ( $p > 0,05$  в обоих случаях). Выявлена зависимость характера изменений численности субпопуляций от исходного числа CD3<sup>+</sup> – лимфоцитов. В случаях дисбаланса CD3<sup>+</sup> – клеток нормализуется численность CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, TNK-субпопуляций лимфоцитов и особенно NK кле-ток. Авторы считают, что полученные данные указывают на интерфероноподобные свойства МТ, его способность стимулировать экспрессию рецепторного аппарата покоящихся лимфоцитов и особенно TNK- и NK- субпопуляций.

**Ключевые слова:** лекарственное растение *Juniperus turcomanica* B. Fedtch., субпопуляции лимфоцитов крови практически здоровых лиц, экспрессия мембранных рецепторов

**INFLUENCE OF THE JUNIPER TURKMEN (JUNIPERUS TURCOMANICA B. FEDTCH.) DECOCTION ON SOME LIMPHOCYTES SUBPOPULATIONS MEMBRANE RECEPTORS' EXPRESSION IN VITRO**

<sup>1</sup>Pleskanovskaya S.A., <sup>1</sup>Tachmuhammedova A.H., <sup>2</sup>Durdyeva O.S.

<sup>1</sup>State medical university of Turkmenistan, Ashkhabad, e-mail: pleskanovskaya\_s@mail.ru;

<sup>2</sup>International diagnostics center, Ashkhabad

At research of a 5% juniper Turkmen (MT) (*Juniperus turcomanica* B. Fedtch.) decoction influence on the some practically healthy persons (PHP) blood lymphocytes subpopulation' character *in vitro* it has been established that in the first 5 minutes of blood incubation in the MT presence the number of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, NK and T-NK lymphocytes' phenotypes significantly increased ( $p < 0,05$  raises; 0,001; 0,05 and 0,05 accordingly). Number of the CD8<sup>+</sup> – and CD19<sup>+</sup> – lymphocytes' practically does not change ( $p > 0,05$  in both cases). Dependence of subpopulations number changes on the initial CD3<sup>+</sup> – lymphocytes' number is revealed. In cases of CD3<sup>+</sup> – cells' disbalance the normalization of CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, TNK- lymphocytes subpopulations number and especially NK cells numerous is observed. The obtained data specifies on interferon like properties of MT, its ability the membrane receptors expression increase the device based lymphocytes and especially TNK – and NK – subpopulations.

**Keywords:** medicinal plant *Juniperus turcomanica* B. Fedtch., subpopulations of healthy persons' blood lymphocytes, membrane receptors' expression

Поиск препаратов направленного действия, способных осуществлять коррекцию иммунного статуса человека и животных, становится все более актуальной проблемой прикладной и фундаментальной иммунологии [12, 22, 24, 28, 29]. Особый интерес представляет поиск таких препаратов среди лекарственных растений [13, 18, 19, 23].

Можжевельник (*Juniperus*) издревле используется в народной и официальной медицине. Ископаемая древесина *Juniperixylon Kalickii* известна из палеоцена полуострова Челекен [1, 11]. В европейской медицинской практике наиболее известны и используются – *Juniperus communis* L. (верес) – [1, 2], *Juniperus davurica* – можжевельник даурский, можжевельник сибирский – *Juniperus sibirica* Burch. D., *Juniperus nana* Willd Pallas и можжевельник казачий – *Juniperus*

*sabina* LB [26]. Из 60 видов можжевельников умеренного пояса северного полушария в бывшем СССР произрастало 20 видов, из которых 12 встречаются на территории Средней Азии [14, 15]. *Juniperus turcomanica* B. Fedtch. – одна из разновидностей можжевельников, произрастающая в Туркменистане. Можжевельник туркменский (МТ) встречается в виде редколесья от нижнего до верхнего пояса гор в Юго-Западном и Центральном Копетдаге (Туркменистан) [26].

Целебные свойства можжевельника туркменского изучаются со времен Авиценны [2, 14] и привлекают внимание большого числа современных исследователей и в том числе авторов настоящей работы [8, 9, 20]. Сравнительно недавно нами было установлено, что при инкубации крови здоровых лиц в присутствии 5% отвара МТ *in vitro*

процентное содержание атипичных лимфоцитов (ALY) и больших незрелых клеток (LIC) прогрессивно снижается уже с 5 минуты инкубации. Поскольку истинного изменения численности лимфоцитов в пробе крови в закрытой системе невозможно, мы допустили, что препарат влияет на экспрессию мембранных рецепторов иммунокомпетентных клеток [17]. Однако, фенотип лимфоцитов, чувствительных к отвару можжевельника, оставался не известным.

Цель настоящего исследования: изучить влияние 5% отвара МТ на экспрессию мембранных рецепторов CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK и T-NK субпопуляций лимфоцитов венозной крови практически здоровых лиц (ПЗЛ) *in vitro*.

### Материалы и методы исследования

Изучены иммунограммы 40 ПЗЛ обоего пола в возрасте 19–25 лет. При выполнении работы был использован проточный цитофлюориметр Beckman coulter (USA). Кровь для исследования в количестве 5,0 мл забирали преимущественно из локтевой вены ПЗЛ при помощи вакутайнеров в специально предназначенные для приборов данного класса одноразовые пробирки (BD VACUTAINER K2E (EDTA) 5.0 ml). После первичного определения численности лимфоцитов фенотипов CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK и T-NK в пробирки вносили по 0,01 мл стерильного 5% отвара МТ, тщательно перемешивали на шейкере при 150 колебаниях в минуту при комнатной температуре (+25°C) в течение 60 минут. Через 5 и 60 минут инкубации повторно определяли численность указанных субпопуляций лимфоцитов в пробе крови.

МТ для исследования получали в Государственном институте лекарственных растений АН Туркменистана в виде высушенной рубленой хвои, расфасованной в бумажные пакеты по 50 гр. 5% от-

вар МТ (infusum ex 10:200) готовили в соответствии с требованиями Фармакопеи (1991) [27] по прописи для *Juniperus communis* L. [16]. В частности, 10,0 гр. сухой измельченной хвои можжевельника туркменского (*Juniperus turcomanica*) заливали водой комнатной температуры, доводили до кипения в водяной бане и выдерживали в этом режиме в течение 15 минут, баню отключали, отвар настаивали в течение 45 минут, затем процеживали и доливали первоначальный объем дистиллированной водой. Препарат готовили непосредственно перед проведением эксперимента.

Полученные данные математически обработаны при помощи компьютерной программы SPSS.

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали, что *in vitro* при условии длительного (в течение 1 часа) перемешивания при комнатной температуре пробы крови в присутствии фитопрепарата изменяется численность некоторых субпопуляций лимфоцитов (табл. 1).

В частности, уже через 5 минут инкубации повышается численность лимфоцитов фенотипов CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, NK и T-NK ( $p < 0,05$ ; 0,001; 0,05 и 0,05 соответственно). Несколько увеличивается против исходной численности CD8<sup>+</sup> – и CD19<sup>+</sup> – лимфоцитов, однако различие математически не достоверно ( $p > 0,05$  в обоих случаях). Через 60 минут инкубации несколько снижается, но остается выше исходного уровня численность CD3<sup>+</sup>– CD4<sup>+</sup>–, NK и T-NK-лимфоцитов, практически не изменяется численность CD8<sup>+</sup> – и CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов. Другими словами, рецепторы CD8<sup>+</sup> – и CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов ПЗЛ *in vitro* не чувствительны к фитопрепарату (в данном случае 5% отвара МТ).

Таблица 1

Численность субпопуляций лимфоцитов (%) в зависимости от времени инкубации в присутствии отвара *Juniperus turcomanica*

Группа	Время	Субпопуляции лимфоцитов					
		CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	SD8 <sup>+</sup>	NK	T-NK
I	до введения препарата	1200±98.3	157±62	632±28	405±39,3	130±12	79±8.7
II	через 5 мин инкуб.	1580±86*	217±24	971±56**	551±89,4	317±25*2,9	110,6±9,6*
III	Через 1 час инкуб.	1440±78*	203±16	892±62*	481,3±56	267,7±26*	105±10*

Примечание. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

Поскольку в присутствии фитопрепарата наибольшие изменения численности пришлись на CD4<sup>+</sup>, NK и T-NK лимфоциты, мы провели корреляционный анализ между численностью изученных субпопуляций лимфоцитов (табл. 2).

Численность CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов является одной из ведущих характеристик функционального состояния иммунной системы человека [28,29]. По этому параметру из числа ПЗЛ мы выделили 3 подгруппы – с численностью CD3<sup>+</sup> лимфо-

**Таблица 2**

Корреляционный анализ численности некоторых субпопуляций лимфоцитов крови практически здоровых лиц

	CD3 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	NK	TNK
CD3 <sup>+</sup>	1	,101	,635	,630	,125	,224
CD19 <sup>+</sup>	,101	1	-,415	,598	,367	,372
CD4 <sup>+</sup>	,635	-,415	1	-,151	,270	-,338
CD8 <sup>+</sup>	,630	,598	-,151	1	-,003	,689*
NK	,125	,367	,270	-,003	1	-,412
TNK	,224	,372	-,338	,689*	-,412	1

Корреляция значима на уровне 0.05 (2–сторон.).

Как видно из таблицы, численность CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов связана достаточно сильной прямой зависимостью с численностью CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> – слабой с – TNK лимфоцитов ( $r = 0,63$ ;  $0,63$  и  $0,22$  соответственно). Она практически не связана корреляционной зависимостью с численностью NK-клеток ( $r = 0,12$ ). Но численность NK и TNK-клеток связана умеренной обратной зависимостью ( $r = -0,412$ ).

цитов, соответствующей популяционной норме (I группа), ниже популяционной нормы (II группа) и – выше таковой (III группа). В I группу вошли 52,5%, во II группу 32,5% и III группу 15% из числа обследованных лиц. Результаты определения численности субпопуляций лимфоцитов в этих подгруппах представлены графически (рис. 1. А, В, С).

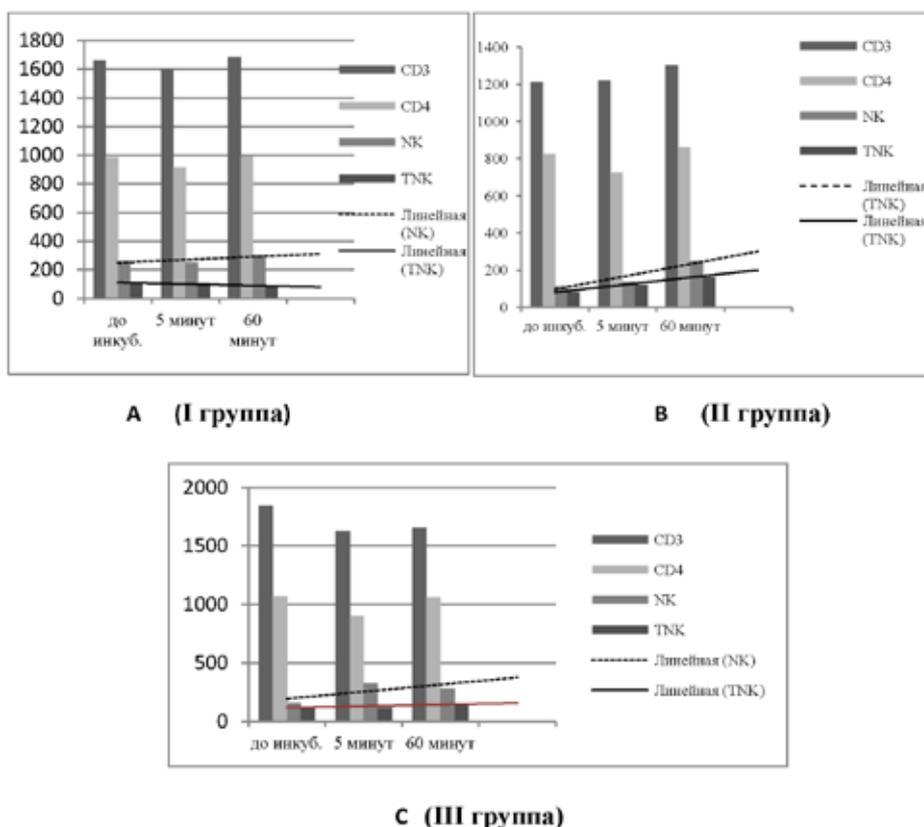


Рис. 1. Численность основных субпопуляций лимфоцитов в венозной крови практически здоровых лиц в зависимости от группы

На представленных диаграммах хорошо видно, что в случаях дисбаланса  $CD3^+$ -клеток (II и III подгруппы) при инкубации пробы крови в присутствии отвара МТ наблюдается тенденция к нормализации численности  $CD3^+$ ,  $CD4^+$ , ТНК-субпопуляций лимфоцитов и особенно НК клеток. Линии тренда для натуральных и тимусзависимых «киллеров» достаточно четко иллюстрируют зависимость их численности от исходного числа  $CD3^+$ -лимфоцитов. Так, при исходно нормальном содержании в крови  $CD3^+$ -лимфоцитов численность «киллеров» в присутствии МТ *in vitro* практически не изменяется (диаграмма А). При исходном дефиците  $CD3^+$ , равно как при избытке – численность ТНК-лимфоцитов и НК клеток у ПЗЛ увеличивается, несмотря на исходную реципрокность их количества в целом по группе (диаграммы В и С). Однако динамика и степень изменения численности «киллеров» в подгруппах различны. Для более четкого представления о характере изменений мы ввели отношение НК/ТНК и представили их графически (рис. 2).

резко увеличивается через 5 минут инкубации в присутствии МТ до  $2,8 \pm 0,1$  ( $p < 0,001$ ) и также резко возвращается к исходному уровню через 60 минут ( $1,23 \pm 0,09$ ).

Таким образом, выявлена чувствительность натуральных и тимусзависимых «киллеров» к МТ *in vitro*, а так же способность фитопрепарата нормализовать их соотношение. При этом, чем более выражен дисбаланс численности  $CD3^+$ -лимфоцитов, тем более чувствительны к препарату субпопуляции «киллеров».

Известно, что НК клетки (натуральные «киллеры») относятся к врожденной системе иммунитета и являются одной из важнейших составляющих первой линии обороны организма против вирус-инфицированных, мутировавших или раковых клеток [6,7, 25]. Натуральные «киллеры» обладают значительным генетически детерминированным репертуаром мембранных рецепторов [7], экспрессия которых зависит от большого числа внешних и внутренних факторов [5]. Как натуральные, так и Т-киллеры распознают клетки-мишени за счет активации

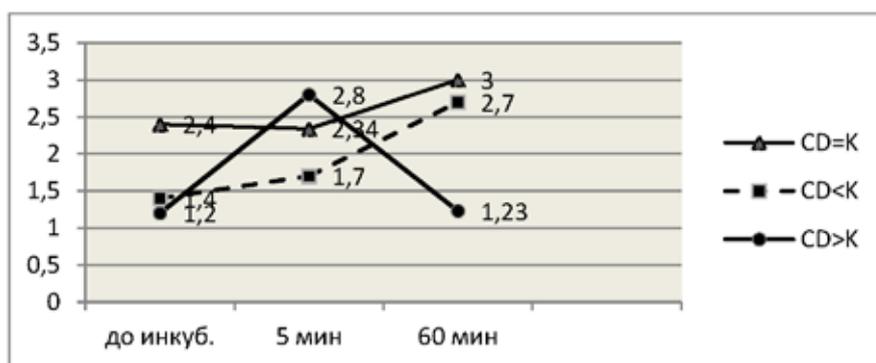


Рис. 2. Отношение численности НК/ТНК в зависимости от времени инкубации и подгруппы обследованных лиц

На диаграмме видно, что при нормальном содержании  $CD3^+$  отношение НК/ТНК составляет  $2,4 \pm 0,5$ . Инкубация пробы крови в присутствии МТ приводит к некоторому увеличению этого отношения и через 60 минут инкубации оно составляет  $3,0 \pm 0,6$ . Однако различие математически не достоверно ( $p > 0,05$ ). При исходном дефиците  $CD3^+$ -лимфоцитов и отношение НК/ТНК составляет  $1,4 \pm 0,1$ , что достоверно ниже против I группы ( $p < 0,05$ ). При инкубации крови в присутствии МТ оно прогрессивно увеличивается до  $2,7 \pm 0,08$  (различие достоверно против исходного уровня,  $p < 0,001$ ). При избытке  $CD3^+$  выявлено самое низкое отношение НК/ТНК ( $1,2 \pm 0,08$ ), которое

или ингибиции мембранных рецепторов [4]. Поскольку численность клеток, определяемая цитфлюориметром *in vitro*, в действительности не может изменяться можно, говорить о модуляциях экспрессии мембранных рецепторов лимфоцитов, инкубированных в присутствии отвара МТ. Известно, что НК клетки могут находиться в так называемом состоянии покоя и активация покоящихся натуральных киллеров происходит в основном под влиянием цитокинов Т-клеток и, в первую очередь, интерферона-гамма [3, 5, 10, 21]. В этой связи, полученные нами данные могут свидетельствовать о цитокиноподобной способности отвара МТ модулировать активность ре-цепторного аппарата

определенных субпопуляций циркулирующих лимфоцитов и особенно «покоящихся» НК-клеток. Кроме того, отвар МТ, на наш взгляд, обладает противовирусным и противоопухолевым потенциалом.

### Список литературы

- Adams R.P., Pandey R.N., Leverenz J.W., Dignard N., Hoegh K., Thorfinnsson T. Pan-Arctic variation in *Juniperus communis*: historical biogeography based on DNA fingerprinting // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2003. – № 3. – P. 181–192.
- Berdimuhamedov G.M. Medical plants of Turkmenistan. / G.M. Berdimuhamedov // Ashkhabad: Turkmenkaya gosudarstvennaya izdatelskaya sluzba, 2009. Vol. I. – 385 p.
- Bryceson Y.T., March M.E., Ljunggren H.G., Long E.O. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion // *Blood*. – 2006. – № 107. – С. 159–166.
- Granucci F., Zanoni I., Pavelka N., Van Dommelen S.L., Andoniou C.E., Belardelli F. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation // *J. Exp. Med.* – 2004. – № 200. – С. 287–295.
- Hollie J. Pegram, Daniel M. Andrews, Mark J. Smyth, Phillip K. Darcy and Michael H. Kershaw. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells // *Immunology and Cell Biology*. – 2011. – № 89. – С. 216–224.
- Karre K. Natural killer cell recognition of missing self / K. Karre // *Nat Immunol.* – 2008. – № 9. – С. 477–480.
- McQueen K.L., Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. / K.L. McQueen, P. Parham // *Curr Opin Immunol.* – 2002. – № 14. – С. 615–621.
- Pleskanovskaya S.A., Gurbandurdyev A. On the possibility of *Juniperus turcomanica* decoction in the chronic tonsillitis patients' treatment using / S.A. Pleskanovskaya, A. Gurbandurdyev // *Turkmen health care J.* – 2003. – № 4. – С. 18–20.
- Pleskanovskaya S.A., Mamedova G., Munir Ozturk, Salih Gucl, Ashyraliyeva M. An Overview of the Ethnobotany of Turkmenistan and Use of *Juniperus turcomanica* in Phytotherapy / S.A. Pleskanovskaya, G. Mamedova, Munir Ozturk, Salih Gucl, M. Ashyraliyeva // In. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement (Medical plants), Ed. Ram J. Singh, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton-London-New York, 2012. – Vol. 6, Chapter 8. – p. 207–220.
- Radaev S., Sun P.D. Structure and function of natural killer cell surface receptors / S. Radaev, P.D. Sun // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 2003. – № 32. – P. 93–114.
- Ram J. Singh Landmark Research in medical plants Phytotherapy / Ram J. Singh // In. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement (Medical plants). Ed. Ram J. Singh, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton-London-New York, 2012. – Vol.6. – Chapter 1. – P.1–13.
- Roitt S. *Immunologia Fundamentos* (11th edition). Buenos Aires; Editorial Médica panamericana, 2008. – P. 94–95.
- Yang G.Yu. Immunopotentiating effect of traditional Chinese drugs—Ginsenoside and glycyrrhiza polysaccharide (in Chinese) / G.Yu. Yang // *Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Peking Union Med. Coll.* – 1990. – № 5. – С. 188–193.
- Каррыев М.О. Арча – лекарственное растение / М.О. Каррыев // Ашхабад: Ылым. – 1971. – 110 С.
- Каррыев М.О., Артемьева М.В., Баева Р.Т., Киселева В.В., Наби-заде Л.И., Оразму-хамедова Н.О. Фармакохимия лекарственных растений Туркменистана / Под ред. проф. А.П. Прокопенко. – Ашхабад: Ылым, 1991. – 203 с.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства, том 1. – М.: Медицина, 1973. – 398 с.
- Плескановская С.А., Тачмухаммедова А.Х. Влияние отвара МТ на популяционный состав лейкоцитов, численность и морфологию тромбоцитов периферической крови условно здоровых лиц *in vitro* / С.А. Плескановская, А.Х. Тачмухаммедова // *Молодой ученый*. – 2015. – № 12. – С. 86–91.
- Плескановская С.А. Иммуностимулирующие препараты: современное состояние проблемы / С.А. Плескановская // *Здравоохранение Туркменистана*. – 2001. – № 4 – С. 34–37.
- Плескановская С.А. Фитоиммунотерапия – возможности и перспективы. / С.А. Плескановская // *Аллергология и иммунология*. – 2005. – Т.6. – №3. – С.325.
- Плескановская С.А., Акыев А. Модуляция иммунного ответа на антиген эхинококковой кисты отварами можжевельника туркменского. / С.А. Плескановская, А. Акыев // *Аллергология и иммунология*. – 2007. – №8. – Т. 1. – С 104.
- Ризопулу А.П. К механизму формирования колебаний экспрессии рецепторов Т-лимфоцитов и активности фагоцитоза у людей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ташкент, 1995. – 25 с.
- Сепиашвили Р.И. Иммунореабилитология на рубеже веков / Р.И. Сепиашвили // *Int. J. Immunorehabil.* – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 5–11.
- Сепиашвили Р.И. Иммуотропные препараты: классификация, проблемы и перспективы / Р.И. Сепиашвили // *Аллергол. Иммунол.* 2001 – № 1. – С. 39–45.
- Сепиашвили Р.И. Основы физиологии иммунной системы. – М.: Медицина-Здоровье. – 2003. – 240 с.
- Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров / Р.И. Сепиашвили, Балмасова И.П. – М.: Медицина – здоровье. – 2005. – 455 с.
- Справочник лекарственных растений Туркменистана (под ред. Каррыева М.О.) / М.О. Каррыев. – Ашгабат: АНТ «Энциклопедия». – 1992. – 88 с.
- Фармакопеея СССР. Изд. 11. Вып.2. – М.: Медицина. – 1990. – 398 с.
- Хайтов Р.М. Иммуномодуляторы: классификация, фармакологическое действие, клиническое применение / Р.М. Хайтов, Б.В. Пинегин // *Фарматека*. – 2004. – № 7. – С. 10–15.
- Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение // *Иммунология*. – 2003. – № 4. – С. 196–203.