ВЛИЯНИЕ ОТВАРА МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ТУРКМЕНСКОГО (*JUNIPERUS TURCOMANICA*) И ЛИЗАТА ЕГО КАЛЛУСНЫХ КЛЕТОК НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ IN VITRO

Плескановская С.А.¹, Тойлиев С.Т.², Какабаев Б.Т.², Семина И.Ф.³, Супруненко Н.Ю.³

¹Государственный медицинский университет Туркменистана, Ашхабад, e-mail: pleskanovskaya_s@mail.ru;

²Научно-клинический центр кардиологии МЗ и МП Туркменистана, Ашхабад;

³Техноцентр АНТ, Ашхабад

Флавоноиды, содержащиеся в можжевельниках, широко используются в кардиопатологии, поскольку обладают способностью понижать уровень холестерина в крови, повышать активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях миокарда. Однако в списке растений, используемых в фитотерапии кардиохирургических больных, не значится можжевельник туркменский (*Juniperus turcomanica*). В настоящее время внимание исследователей все более привлекают не только лекарственные растения, но и культуры их каллусных клеток. Каллусные клетки (КК) – по сути, стволовые, тотипотентные клетки, культуры которых рассматривают как источник получения и накопления тканей любых частей растений, и в первую очередь экономически и биологически значимых. Однако в списке используемых в медицине культур каллусных клеток МТ (*Juniperus turcomanica*) не значится. Авторами исследован характер влияния 5% отвара можжевельника туркменского (*Juniperus turcomanica*) и лизата его каллусных клеток (ККМТ) на спонтанную и индуцированную растворимым кардиальным антигеном миграцию лейкоцитов периферической крови (ЛПК) 58 кардиохирургических больных (КХБ) и 30 практически здоровых лиц (ПЗЛ) *in vitro*. Показано, что препараты *in vitro* преимущественно тормозят как спонтанную, так и индуцированную кардиальным антигеном миграцию лейкоцитов крови как практически здоровых лиц, так и кардиохирургических больных. Авторы считают, что полученные данные указывают на противовоспалительные и кардиопротекторные свойства можжевельника туркменского и лизата его каллусных клеток.

Ключевые слова: кардиохирургические больные, можжевельник туркменский (*Juniperus turcomanica*), лизат каллусных клеток можжевельника туркменского, спонтанная и индуцированная растворимым кардиальным антигеном миграция лейкоцитов крови.

INFLUENCE OF TURKMEN' JUNIPER (*JUNIPERUS TURCOMANICA*) DECOCTION AND ITS CALLUS CELLS' LYSATES ON THE CARDIO-SURGICAL PATIENTS' BLOOD LEUKOCYTES FUNCTIONAL ACTIVITY IN VITRO

Pleskanovskaya S.A.¹, Toyliyev S.T.², Kakabayev B.T.², Semina I.F.³, Suprunenko N.Y.³

¹State medical university of Turkmenistan, Ashkhabad, e-mail: pleskanovskaya_s@mail.ru;

²Scientific-clinical center of cardiology of Ministry of Health and the medical industry of Turkmenistan, Ashkhabad;

³The technological center of Academy of Sciences of Turkmenistan, Ashkhabad

Flavonoids, containing in junipers, are widely used in cardio-pathology as possess ability to decrease cholesterol level in blood, to raise activity of antioxidant enzymes protection in myocardial tissues. However in the list used in herbal medicine cardio-surgical patients, does not appear a Turkmen' juniper (*Juniperus turcomanica*). Now attention of researchers more and more involve not only medicinal plants, but also their callus cells' cultures. Callus cells - as a matter of fact, are totipotent cells, which cultures consider as a source of reception and accumulation of tissues of any parts of plants and first of all economically and medical significant. However in the list of using in medicine callus cells cultures *Juniperus turcomanica* does not appear. The character of 5 % decoction Turkmen' juniper (*Juniperus turcomanica* - JT) and its callus cells lysate (CCL) effect on spontaneous and induced soluble cardiac antigens peripheral blood leukocytes' (RLMI) migration in 58 cardio-surgical patients (CSP) and 30 practically healthy persons (PHP) *in vitro* has been studied. It was shown that both preparations *in vitro* mainly inhibit spontaneous and antigen induced migration of blood leukocytes in PHP and CSP as well. The authors consider that the obtained data specify anti-inflammatory and cardio protected properties of Turkmen' juniper and its callus cells lysates.

Keywords: cardio-surgical patients, turkmen' juniper (*Juniperus turcomanica* - JT), JT' callus cells lysates, spontaneous and soluble cardiac antigens induced peripheral blood leukocytes' migration.

Хирургическое лечение самой различной патологии сердца позволяет сохранить жизни огромного числа пациентов [1]. Тем не менее консервативная медикаментозная терапия болезней сердца и сосудов (в том числе с использованием фитопрепаратов) остается актуальной не только при лечении патологии миокарда, но и для профилактики послеоперационных осложнений у кардиохирургических больных [2; 3].

Можжевельник (*Juniperus*) - растение из семейства кипарисовых (*Cupressaceae*), издревле используется в народной и официальной медицине. Флавоноиды, содержащиеся в можжевельниках, широко используются в кардиопатологии, поскольку обладают способностью понижать уровень холестерина в крови [4], повышать активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях миокарда [5]. Однако в списке используемых в фитотерапии можжевельников не значится можжевельник туркменский (*Juniperus turcomanica*).

Juniperus turcomanica B. Fedtsch. (МТ) – одна из разновидностей можжевельников, произрастает в предгорьях Юго-Западного и Центрального Копетдага (Туркменистан). Целебные свойства можжевельника туркменского изучаются со времен Авиценны и продолжают привлекать внимание большого числа современных исследователей. Плоды МТ, так же как европейских представителей этого вида, богаты сахаристыми веществами, гликозидами, кумаринами, флавоноидами, что позволяет допустить его высокую биологическую активность и эффективность при лечении заболеваний сердца и сосудов [6].

Внимание исследователей во всем мире все более привлекают не только и не столько лекарственные растения, сколько культуры их каллусных клеток. Каллусные клетки (КК) – по сути, стволовые, тотипотентные клетки, культуры которых рассматривают как источник получения нового поколения фитопрепаратов [7]. В настоящее время из биомассы каллусных клеток культуры ткани живучки мохнатой (*Ajuga reptans*), раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) налажено производство антиаритмического лекарственного средства «Аймалин» [8]. Однако в списке культур каллусных клеток, используемых в медицине, МТ (*Juniperus turcomanica*) не значится.

Целью настоящего исследования являлось определение характера влияния 5% отвара можжевельника туркменского (*Juniperus turcomanica*) и лизата его каллусных клеток (ЛКК) на миграционную активность лейкоцитов периферической крови (ЛПК) кардиохирургических больных (КХБ) *in vitro*.

Материалы и методы исследования. В исследовании использованы ЛПК 35 кардиохирургических больных обоего пола, в том числе – 20 больных с декомпенсированным пороком митрального клапана (ДКПМК), 3 - миксомой сердца (МКС),

12 - с ИБС. Средний возраст больных составил $39,7 \pm 1,9$ года. В контрольную группу вошли 30 практически здоровых лиц (ПЗЛ) – волонтеров обоего пола в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст составил $33,7 \pm 1,3$ года). Кровь для исследования забирали из вены обследуемых лиц. Кардиохирургических больных обследовали до и после соответствующего хирургического лечения.

Миграционная активность ЛПК изучена в модифицированной реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) [9]. Результаты выражены в виде индекса миграции лейкоцитов (ИМЛ). Растворимый кардиальный антиген (РКА) приготовлен методом водно-солевой экстракции из кусочков ткани сердца пяти молодых здоровых человек в возрасте от 18 до 30 лет, погибших от случайной причины. Полученный антиген дозирован по содержанию белка – не менее 20 мкг/мл [10].

5% отвар МТ можжевельника туркменского (*Juniperus turcomanica*) приготовлен в соответствии с требованиями Фармакопеи [11].

Каллусные клетки МТ выращены на среде Мурасиге – Скуга [12] из экспланта хвои растения. Лизат готовили из цельной ткани каллуса следующим образом: 50 мг ткани каллуса гомогенизировали в 10 мл физиологического раствора хлорида натрия при помощи гомогенизатора Поттера. Гомогенат замораживали при -20°C . Процедуру замораживания-оттаивания повторяли трижды. Затем гомогенат сутки выдерживали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 60 минут. После центрифугирования супернатант отбирали в стерильную пробирку и хранили до использования при -20°C . Все манипуляции проведены в стерильных условиях бокса с соблюдением правил асептики.

При постановке РТМЛ в камеры вносили среду культивирования и погружали капилляры с кровью обследуемых лиц. До погружения капилляров и через 5 минут после предварительного внесения РКА в лунки вводили по 1,0 мкл 5% отвара МТ или лизата его КК (ЛКК). По истечении времени инкубации капилляры удаляли и подсчитывали индекс миграции лейкоцитов.

Полученные данные обработаны при помощи программы SPSS statistic.

Результаты исследования и их обсуждение. Характеристика обследованных лиц представлена в таблице 1.

Таблица 1

Группы обследованных лиц

Группа	Диагноз	Количество обследованных лиц	Пол		Возраст
			жен.	муж.	
1.	МКС	3	3	-	$37,9 \pm 2,7$

2.	ДКПМК	20	9	11	29,2±4,2
3.	ИБС	35	11	19	46,7±9,2*
4.	ПЗЛ	30	12	18	27,9±2,8

Примечание: * - соответствует $p < 0,05$ по отношению к группе контроля.

Из таблицы 1 следует, что было обследовано 23 кардиохирургических больных (КХБ) женского пола и 30 – мужского. Группа больных с миксомой сердца (МКС) представлена больными исключительно женского пола, в остальных группах преобладали больные мужского пола. Возраст больных с ишемической болезнью сердца (ИБС) выше по сравнению с другими группами КХБ, но достоверно отличается только от возраста лиц контрольной группы ($p < 0,05$).

Исследования показали, что индекс миграции лейкоцитов (ИМЛ) в присутствии РКА в целом по группе КХБ достоверно повышен по отношению к группе практически здоровых лиц (ПЗЛ) и составляет $127,5 \pm 21$ против $57,3 \pm 1,5$ ($p < 0,05$). Величина индекса в определенной степени зависит от диагноза. Так, при поступлении в клинику максимальная величина ИМЛ наблюдается у больных с ДКПМК ($p < 0,01$ по отношению к группе здоровых лиц), минимальная – с МКС ($p < 0,05$ по отношению к группе здоровых лиц) (таблица 2).

Таблица 2

Значение индекса миграции лейкоцитов у кардиохирургических больных (КХБ) в зависимости от диагноза и времени обследования

Группа больных	Величина индекса миграции (ИМЛ) в динамике послеоперационного периода			
	До операции	3-и сутки после операции	7-е сутки после операции	При выписке
ДКПМК	140,9±15,3 5	155,7±18,7	122,9±11,3	89,9±9,2*
МКС	115,5±10,7 3	142,7±11,2*	117,3±9,2	92,5±7,8*
ИБС	126,2±12,8	133,7±19,2	112,3±9,7	79,5±6,3*
ПЗЛ	57,3±1,5			

Примечание: * - $p < 0,05$ по отношению к группе здоровых лиц.

Достоверного различия величины ИМЛ в зависимости от диагноза нами не выявлено ($p > 0,05$ во всех случаях). В течение первых трех суток после операции величина ИМЛ нарастает во всех группах больных, с 5-7 суток прогрессивно снижается как по отношению к исходному уровню, так и по отношению к 3-м суткам после операции ($p < 0,05$ во всех случаях).

Рис. 1. Структура модуляций величины ИМЛ в присутствии отвара можжевельника (А, В) и лизата его каллусных клеток (С, D) в зависимости от группы обследованных лиц

Как отвар можжевельника, так и лизат его каллусных клеток *in vitro* в значительно большем числе случаев и в большей степени тормозят миграцию лейкоцитов крови КХБ, индуцированную кардиальным антигеном (рисунок 2).

Рис. 2. Значения ИМЛ в зависимости от индуктора миграции лейкоцитов и группы обследованных лиц

На диаграмме видно, что присутствие кардиального антигена (КАГ) тормозит миграцию лейкоцитов практически здоровых лиц, в то время как у КХБ резко стимулирует

ее ($p < 0,01$). Отвар можжевельника и лизат его каллусных клеток модулируют как спонтанную, так и индуцированную КАГ миграцию лейкоцитов, но в различной степени. Так, в присутствии лизата каллусных клеток ИМЛ у практически здоровых лиц (ПЗЛ) снижается в 1,2 раза (то есть практически не изменяется), но у кардиохирургических больных (КХБ) он снижается в 1,9 ($p < 0,01$). Кроме того, они существенно тормозят миграцию лейкоцитов крови КХБ, индуцированную кардиальным антигеном (КАГ). При этом ИМЛ в присутствии лизата каллусных клеток снижается в 1,57 раза ($p < 0,5$), в присутствии отвара МТ – в 1,79 раза ($p < 0,5$). То есть лейкоциты крови КХБ значительно более чувствительны к препаратам можжевельника *in vitro* по сравнению с лейкоцитами практически здоровых лиц.

Известно, что миграция лейкоцитов (нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов) является ключевым событием в реализации иммунного ответа организма на чужеродные антигены [13]. Направленная миграция лейкоцитов *in vivo* характерна для воспалительных процессов самой различной этиологии, и от этого в значительной мере зависит исход воспаления. Направление миграции лейкоцитов и ее скорость определяются большим числом внешних факторов (их называют хемоаттрактантами) и их градиентом. Примерами хемоаттрактантов являются 5-й компонент комплемента (C5), интерлейкин 8 (IL-8), N-формил-метил-лейцил-фенилаланин (fMLP) и другие гликопротеиновые молекулы [14]. Способность препаратов можжевельника туркменского модулировать миграцию лейкоцитов крови из стеклянного капилляра *in vitro* соответствует свойствам хемоаттрактантов. Знак модуляции миграции, скорее всего, зависит от экспрессии соответствующих рецепторов на поверхности клеток-мишеней (например, кардиомиоцитов). В результате чего препараты способны как тормозить, так и стимулировать атаку тканей миокарда аутологичными, сенсibilизированными к кардиальному антигену лейкоцитами. Другими словами, препараты можжевельника, и особенно его каллусных клеток, обладают цитокиноподобными свойствами и могут влиять на функциональную активность распознающих Т-лимфоцитов (TLR) и, следовательно, на характер их взаимодействия с мишенью – в данном случае с мембранными антигенами кардиомиоцитов.

Вполне возможно, что на сенсibilизированных к кардиальному антигену лейкоцитах имеется рецептор к определенным молекулам отвара можжевельника туркменского и/или его каллусных клеток. Во всяком случае каллусные клетки, как любые стволовые клетки, содержат огромный набор биологически активных молекул, участвующих в процессах активации и пролиферации клеток [15], часть из которых может играть роль хемоаттрактантов или, напротив, блокаторов интегринов и/или молекул адгезии.

На наш взгляд, совокупность полученных данных позволяет считать, что

использование отвара можжевельника (и в том числе *Juniperus turcomanica*) опосредовано не только его антиоксидантными свойствами [4; 5], но и способностью как самого отвара, так и лизата его каллусных клеток модулировать иммунный ответ лейкоцитов крови человека на кардиальные антигены. Высокая чувствительность лейкоцитов крови кардиохирургических больных к отвару можжевельника туркменского и лизату его каллусных клеток *in vitro* может быть вполне реализована *in vivo*.

Выводы

1. 5% отвар можжевельника туркменского (*Juniperus turcomanica*) и лизат его каллусных клеток (ЛКК) обладают способностью тормозить *in vitro* спонтанную миграцию лейкоцитов крови практически здоровых лиц и кардиохирургических больных из стеклянного капилляра, что свидетельствует об их иммуномодулирующих и противовоспалительных свойствах.

2. 5% отвар можжевельника туркменского (*Juniperus turcomanica*) и ЛКК *in vitro* подавляют индуцированную кардиальным антигеном миграцию лейкоцитов крови как кардиохирургических больных, так и практически здоровых лиц, что, на наш взгляд, свидетельствует о кардиопротекторных свойствах данных веществ.

Список литературы

1. Бокерия Л.А. Современные тенденции развития сердечно-сосудистой хирургии (20 лет спустя) // Анналы хирургии. 2016. № 21 (1-2). С. 10-18.
2. Babak Baharvand-Ahmadi¹, Mahmoud Bahmani. Overview of medicinal plants used for cardiovascular system disorders and diseases in ethnobotany of different areas in Iran. J. Herb. Med. Pharmacol. 2016. no. 5. vol. 1. P. 39-44.
3. Gail B. Mahady Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Coronary Heart Disease. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) Selected Medicinal Plants. Volume II. WHO Traditional Medicine Programme, Geneva, Switzerland. 2010. P. 75-100.
4. Akdogan M., Koyu A., Ciris M., Yildiz K. Anti-hypercholesterolemic activity of *J. communis* Oil in rats: a biochemical and histopathological investigation. Biomedical Research. 2012. vol. 3. no 23. P. 321-328.
5. Gumral N., Kumbul D.D., Aylak F., Saygin M., Savik E. *Juniperus communis* Linn oil decreases oxidative stress and increases antioxidant enzymes in the heart of rats administered a diet rich in cholesterol. Toxicol. Ind. Health. 2015. vol. 31. no 1. P. 85-91. DOI: 10.1177/0748233712469995. Epub 2013 Jan 4.
6. Бердымухамедов Г.М. Лекарственные растения Туркменистана. Ашхабад: Туркменская

государственная издательская служба. 2009. Том 1. 385 с.

7. Narges Khanpour-Ardestani, Mozafar Sharifi and Mehrdad Behmanesh Establishment of callus and cell suspension culture of *Scrophularia striata* Boiss: an in vitro approach for acteoside production. *Cytotechnologist*. 2015. vol. 67. no 3. P. 475-485. DOI:10.1007/s10616-014-9705-4.
8. Филиппова В.Н. , Володина С.О., Смоленская И.Н., Зоринянц С.Э., Володин В.В. Противовоспалительные свойства экистероидов в культурах каллусных клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* // *Химия растительного сырья*. 2002. № 1. С.57-62.
9. Плескановская С.А. Клеточный и гуморальный иммунный ответ при кожном лейшманиозе (экспериментальные исследования и наблюдения на больных): автореф. дис. ... канд. мед. наук, Москва, 1982. 22 с.
10. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина. 1987. 345 с.
11. Фармакопея СССР. Изд. 11. Вып.2. М.: Медицина.1990. 398 с.
12. Rashmi Yadav, Karen Y. Larbi, Rebecca E. Young, Sussan Nourshargh. Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thromb. Haemost.* 2003. no 90. P. 598-606.
13. Nitin Agrawal, Mehmet Toner and Daniel Irimia Neutrophil migration assay from a drop of blood. *Lab Chip*. 2008. vol. 12. no 8. P. 2054-2061. DOI: 10.1039/b813588f.
14. Höferl M., Stoilova I., Schmidt E., Wanner J., Jirovetz L., Trifonova D. Chemical composition and antioxidant properties of Juniper Berry (*J. communis* L.) Essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. *Antioxidants*. 2014. vol. 3. no 1. P.81-98.
15. Зубов Д.А. Стволовые клетки растений и животных: две стороны одной медали. Часть 1 // *Гены & клетки*. 2016. № 3. Т. XI. С. 14-22.