

КУЛЬТУРА МОНОЦИТОВ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ *IN VITRO*

Николенко М.В., Костоломова Е.Г., Сивкова Д.С., Борисенко А.И.,
Барышникова Н.В., Малишевская О.И., Васева Е.М.,
Приходько Ю.С.

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Тюмень, Россия

Резюме. Целью исследования являлось изучение иммуотропных эффектов фармацевтической композиции на основе метаболитов пробиотического штамма и растительных компонентов различного происхождения на моноциты человека *in vitro*. Авторами предложен экзометаболит *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) как основа всех предлагаемых составов для регенерации эпителиоцитов человека. В состав смесей входили экстракт зверобоя и масло кориандра. Эффективность полученных фармацевтических средств оценивали на моноцитах взрослого человека. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом градиентного центрифугирования. Моноциты высевали в 24-луночные планшеты, сокультивировали с исследуемыми композициями (опыт) и без добавления композиций (контроль). Для идентификации поверхностных маркеров линии моноцитов/макрофагов использовались моноклональные антитела. Фенотипический анализ моноцитов проводили с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX. Характеристика фенотипа М2 проводилась с использованием антител CD204, CD163 и CD206, тогда как фенотип М1 исследовался с использованием антител CD80 и CD86. Экспериментально доказано, что сокультивирование с экстрактом зверобоя индуцировало культивируемые моноциты к приобретению фенотипа М1, при этом наблюдалось достоверное повышение экспрессии всех поверхностных маркеров для TLR4 CD80 и CD86. Экспрессию маркеров фенотипа М2 по сравнению с нестимулированными клетками, экстракт кориандра напротив, достоверно подавлял. Процентное соотношение моноцитов М2-фенотипа CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺ было увеличено после совместного культивирования как с маслом, так и после сокультивирования с метаболитами *S. boulardii* для всех исследуемых маркеров. Воздействие масла кориандра, так и смеси №1 значительно снизило экспрессию генов всех маркеров М1: TLR4, CD80, CD86. Понижающий эффект экспрессии маркеров М1 сохранялся после добавления метаболитов *S. boulardii* только для TLR4

Адрес для переписки:

Николенко Марина Викторовна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54.
Тел.: 8 (3452) 69-07-82.
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Address for correspondence:

Marina V. Nikolenko
Tyumen State Medical University
54 Odesskaya St
Tyumen
625023 Russian Federation
Phone: +7 (3452) 69-07-82.
E-mail: nikolenko-marina@mail.ru

Образец цитирования:

М.В. Николенко, Е.Г. Костоломова, Д.С. Сивкова, А.И. Борисенко, Н.В. Барышникова, О.И. Малишевская, Е.М. Васева, Ю.С. Приходько «Культура моноцитов как модель для тестирования фармацевтических композиций *in vitro*» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 393-398. doi: 10.46235/1028-7221-17170-MCA

© Николенко М.В. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.V. Nikolenko, E.G. Kostolomova, D.S. Sivkova, A.I. Borisenok, N.V. Baryshnikova, O.I. Malishevskaya, E.M. Vaseva, Yu.S. Prikhodko "Monocyte culture as a model for *in vitro* testing of pharmaceutical compositions", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 393-398. doi: 10.46235/1028-7221-17170-MCA

© Nikolenko M.V. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17170-MCA

и CD 86 по сравнению с контролем. Субпопуляция моноцитов фенотипа TLR4⁺, CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺, коэкспрессирующие маркеры поляризации M1 и M2 выявлены при сокультивировании со смесями как 2, так и 3. Процент гибридных TLR4⁺M2-моноцитов был значительно выше в смеси 2 по сравнению со смесью 3 ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно). Таким образом, различные исследуемые смеси вызывают поляризацию моноцитов в M1/M2 в зависимости от состава композиции, что позволяет рекомендовать к использованию в косметологии и, возможно, лечебной практике в зависимости от этиологии заболевания.

Ключевые слова: моноциты, метаболиты, экстракт зверобоя, масло кориандра, интерлейкины, цитокины

MONOCYTE CULTURE AS A MODEL FOR *IN VITRO* TESTING OF PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

Nikolenko M.V., Kostolomova E.G., Sivkova D.S., Borisenok A.I., Baryshnikova N.V., Malishevskaya O.I., Vaseva E.M., Prikhodko Yu.S.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. This study aimed to investigate the immunotropic effects of a pharmaceutical composition based on a probiotic strain metabolites, and plant components of various origin using an *in vitro* model of human monocyte culture. The authors propose a mixture of exometabolites from *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) as the basis of all suggested formulations aimed at regeneration of human epithelial cells. The compositions included St. John's wort extract and coriander oil. The effectiveness of these pharmaceutical compositions was evaluated using monocytes isolated from adult donors. Mononuclear cells (MNCs) were isolated by gradient centrifugation. The monocytes were seeded into 24-well plates, co-cultured with the studied compositions (experimental samples) and without compositions (controls). Monoclonal antibodies were used to identify cell markers of monocyte/macrophage lineage. Phenotypic analysis of monocytes was performed using a CytoFLEX flow cytometer. The M2 phenotype was characterized using CD204, CD163, and CD206 antibodies, whereas the M1 phenotype was assessed using CD80 and CD86 antibodies. It was proven that co-cultivation with St. John's wort extract induced cultured monocytes to acquire the M1 phenotype, while a significantly increased expression of all surface markers for TLR4, CD80, and CD86 was observed. In contrast, the coriander extract (mixture #1) significantly inhibited the expression of M2 phenotype markers compared with unstimulated cells. The percentage of M2 monocytes (CD204⁺, CD206⁺, and CD163⁺ phenotypes) was increased after co-cultivation with both oil and after co-cultivation with *S. boulardii* metabolites for all the studied markers. Exposure to coriander oil and mixture No. 1 significantly reduced the gene expression of all M1 markers, i.e. TLR4, CD80, CD86. The reducing effect of M1 marker expression persisted after addition of *S. boulardii* metabolites only for TLR4 and CD86 compared with the control. A subpopulation of monocytes with TLR4⁺, CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺ phenotype, coexpressing the M1 and M2 polarization markers was detected during co-cultivation with both mixtures #2 and #3. The percentage of hybrid TLR4⁺M2 monocytes was significantly higher in mixture 2 compared with mixture 3 ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). Hence, the mixtures under study cause M1/M2 monocyte polarization depending on the composition, thus recommending its potential usage in cosmetology and medical practice, depending on etiology of the disease.

Keywords: monocytes, metabolites, St. John's wort extract, coriander oil, interleukins, cytokines

Введение

Возможность использования краткосрочной культуры моноцитов, фибробластов, полиморфноядерных лейкоцитов, выделенных из периферической донорской крови, для оценки биологической активности различных типов

биоразлагаемых полимерных частиц, волокнистых и пленочных субстратов микро- и наноразмеров, фуллеренов, различных фармацевтических композиций потенциально разрабатывается в настоящее время. Бесклеточные супернатанты микроорганизмов обладают широким спектром

разнообразных иммунологических эффектов. В литературе имеются сообщения о том, что метаболиты пробиотических штаммов обладают как противовоспалительными, так и провоспалительными свойствами [1].

Моноциты представляют собой пластичные клетки, способные переключать свой фенотип в ответ на стимулы и сигналы микроокружения [6]. На основании экспрессии маркеров клеточной поверхности, продукции специфических цитокинов и биологической активности клеток было описано две основные субпопуляции моноцитов: классически активированные или воспалительные М1 и альтернативно активированные или противовоспалительные М2. Парадигма М1/М2 возникла аналогично парадигме Th1/Th2, описанной ранее для Т-хелперов в зависимости от участия в различных типах иммунного ответа [4].

Цель исследования – изучить иммуотропные эффекты фармацевтической композиции на основе метаболитов пробиотического штамма и растительных компонентов различного происхождения на моноциты человека *in vitro*.

Материалы и методы

Фармацевтические композиции содержали метаболит, полученный из дрожжей *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) по методике Перуновой Н.Б. с соавт. [2011]. Культивирование *S. boulardii* проводилось на бульоне Шедлера при 37 °С в течение 24 часов. Стерильность супернатантов проверяли путем посева на 5% кровяной агар с последующим инкубированием при 37 °С в течение 24 ч. Полученный экзометаболит *S. boulardii* являлся основой всех предлагаемых составов для регенерации эпителиоцитов человека. В композицию № 1 добавляли 7% масла кориандра от общего объема. Фармацевтическая композиция № 2 содержала 0,7 мл экстракта травы зверобоя продырявленного. Вариант № 3 содержал сочетанное произведение масла кориандра и травы зверобоя продырявленного. Отдельно исследовали стерильные бесклеточные супернатанты *S. boulardii*, масло кориандра и экстракт травы зверобоя. Эффективность полученных фармацевтических средств оценивали на моноцитах взрослого человека.

В исследование были включены 6 человек условно здоровых лиц без острой соматической патологии на момент обследования, (3 мужчин и 3 женщин, средний возраст 34±14 лет). Исследования выполнялись в день забора крови. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли методом градиентного центрифугирования (400 g)

в градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) $\rho = 1,077\text{г/см}^3$. Оценку иммуномодулирующей активности фармацевтических композиций проводили на модели клеток врожденного и адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro* [2]. Моноцитарную фракцию получали, используя способность клеток моноцитарно-макрофагального ряда прилипать к стеклу и пластику. Для этого суспензию МНК в концентрации 2×10^6 кл/мл культивируют в полной культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) и 80 мкг/мл гентамицина, в CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 40 мин собирали не прилипающие клетки, а прилипающие клетки (моноциты) снимали со дна чашки охлажденным (4–6 °С) раствором Версена, который заливали по 1 мл в чашку сразу после удаления надосадочной жидкости. Через 1–2 мин собирали моноциты, помещали в силиконированные центрифужные пробирки. Центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Удаляли надосадочную жидкость и моноциты ресуспендировали в полной культуральной среде. Моноциты высевали в количестве 1×10^6 в 24-луночные планшеты сокультивировали с исследуемыми композициями (опыт) и без добавления композиций (контроль). Культивировали в полной культуральной среде в CO₂ инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов. Фенотипический анализ моноцитов проводили с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для этого 100 мкл моноциты инкубировали в течение 30 мин с 10 мкл моноклональных антител. Для идентификации поверхностных маркеров линии моноцитов/макрофагов использовались моноклональные антитела (Beckman Coulter, США) CD14. Характеристика фенотипа М2 проводилась с использованием антител CD204, CD163 и CD206, тогда как фенотип М1 исследовался с использованием антител CD80 и CD86.

Результаты и обсуждение

Макрофаги представляют собой гетерогенную популяцию клеток, играющую важную роль в защитных механизмах и гомеостазе. Макрофаги М1 характеризуются повышенным уровнем экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 и толл-подобного рецептора 4 (TLR4). Этот тип макрофагов склонен вырабатывать провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли (TNF) α , интерлейкин (IL)-1 β и IL-6, а также вырабатывать оксид азота (NO) или

реактивные кислородные интермедиаты (ROI) для защиты от патогенов [5]. Напротив, поляризованные макрофаги M2 экспрессируют высокие уровни поверхностных маркеров CD 204, CD 163 и CD 206. А также способствуют выработке противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10, трансформирующий фактор роста β (TGF- β), и вырабатывают полиамины и пролин, которые способствуют разрешению воспаления и восстановлению тканей [6].

Экспериментально доказано, что сокультивирование с экстрактом зверобоя индуцировало культивируемые моноциты к приобретению фенотипа M1, при этом наблюдалось достоверное повышение экспрессии всех поверхностных маркеров для TLR4 ($p < 0,05$), а также CD80 и CD86 ($p < 0,01$) по сравнению с нестимулированными клетками. В то же время экстракт зверобоя значительно подавлял экспрессию маркеров фенотипа M2 по сравнению с нестимулированными CD163 и CD206 ($p < 0,01$), CD204 ($p < 0,05$). Процентное соотношение моноцитов M2-фенотипа CD204⁺, CD206⁺, CD163⁺ было значительно увеличено после совместного культивирования как с маслом кориандра по сравнению с контролем ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,001$ соответственно), так и после сокультивирования с метаболитами *S. boulardii* ($p < 0,01$) для всех исследуемых маркеров. Аналогичный ответ наблюдался при добавлении смеси 1, где одним из компонентов является масло кориандра (CD163, CD204 и CD206 ($p < 0,05$) по сравнению с необработанными). Как воздействие масла кориандра, так и смеси

1 значительно снизило экспрессию генов всех маркеров M1: TLR4, CD80, CD86 ($p < 0,01$ по сравнению с необработанными). Понижающий эффект экспрессии маркеров M1 сохранялся после добавления метаболитов *S. boulardii* только для TLR4 и CD 86 по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для обоих маркеров). Моноциты («гибридные» моноциты), коэкспрессирующие маркеры поляризации M1 и M2, наблюдались при сокультивировании со смесями 2, и 3. Процент циркулирующих гибридных TLR4⁺M2 был обнаружен значительно выше в смеси 2 по сравнению со смесью 3 ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно) и с гиперплазией хрящевых клеток (для обеих популяций клеток).

Выводы

Исследуемые смеси вызывают поляризацию моноцитов в M1/M2 в зависимости от состава композиции. В этой связи их можно рекомендовать к использованию в косметологии и, возможно, в лечебной практике, в зависимости от этиологии заболевания и желаемого исхода.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность ректору Тюменского ГМУ И.М. Петрову, проректору по научно-исследовательской работе и инновационной политике Е.Б. Храмовой.

Список литературы / References

1. Барышникова Н.В., Васева Е.М., Сивкова Д.С., Борисенок А.И., Малишевская О.И., Приходько Ю.С., Николенко М.В. Влияние композиционного состава на основе экзометаболитов *Saccharomyces boulardii* в отношении патогенных и персистентных свойств грибов рода *Candida* // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 3. С. 493-498. [Baryshnikova N.V., Vaseva E.M., Sivkova D.S., Borisenok A.I., Malishevskaya O.I., Prikhodko Yu.S., Nikolenko M.V. The influence of a composition based on exometabolites of *Saccharomyces boulardii* in relation to the pathogenic and persistent properties of fungi of the genus *Candida*. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2024, Vol. 27, no. 3, pp. 493-498. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-16693-ТЮ.
2. Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Перунова Н.Б., Полянских Е.Д., Сахаров Р.А., Комарова А.В. Оценка иммуномодулирующей активности *Bifidobacterium bifidum* 791 на модели клеток врожденного и адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 2. С. 213-218. Kostolomova E.G., Timokhina T.Kh., Perunova N.B., Polyanskikh E.D., Sakharov R.A., Komarova A.V. *In vitro* evaluation of immunomodulatory activity of *Bifidobacterium bifidum* 791 in the cell model of innate and adaptive immunity. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 2, pp. 213-218. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE.
3. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.*, 2014. Vol. 5, 532. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532.

4. Tuzlak S., Dejean A.S., Iannacone M., Quintana F.J., Waisman A., Ginhoux F., Korn T., Becher B. Repositioning T_H cell polarization from single cytokines to complex help. *Nat. Immunol.*, 2021, Vol. 22, no. 10, pp. 1210-1217.
5. Fernando M.R., Reyes J.L., Iannuzzi J., Leung G., McKay D.M. The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *PloS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188.
6. Yang J., Zhang L., Yu C., Yang X.F., Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Res.*, 2014, Vol. 2, no. 1, 1. doi: 10.1186/2050-7771-2-1.

Авторы:

Николенко М.В. — д.б.н., профессор кафедры микробиологии, заведующая лабораторией микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Сивкова Д.С. — ассистент кафедры микробиологии, младший научный сотрудник лаборатории микробиома, регенеративной медицины и клеточных технологий ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Борисенок А.И. — к.фарм.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Authors:

Nikolenko M.V., PhD, MD (Biology), Professor of the Department of Microbiology, Head of the Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cellular Technologies, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Sivkova D.S., Assistant Professor of the Department of Microbiology, Junior Researcher of the Laboratory of Microbiome, Regenerative Medicine and Cellular Technologies, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Borisenok A.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Барышникова Н.В. — старший преподаватель кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Малишевская О.И. — к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Васева Е.М. — к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Приходько Ю.С. — ассистент кафедры фармацевтических дисциплин ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Baryshnikova N.V., Senior Lecturer, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Malishevskaya O.I., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Vaseva E.M., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Prihodko Yu.S., Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Disciplines, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 29.03.2025

Отправлена на доработку 09.04.2025

Принята к печати 25.05.2025

Received 29.03.2025

Revision received 09.04.2025

Accepted 25.05.2025