

УДК 57.086.82:612.112.7:612.112.95

DOI: 10.36604/1998- 5029-2020-78-128-134

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ МОНОЦИТОВ МЕТОДОМ АДГЕЗИИ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ *IN VITRO*

Д.А.Гассан, О.О.Котова, Д.Е.Наумов, И.Ю.Сугайло, Я.Г.Горчакова, А.А.Синюк

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр
физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

РЕЗЮМЕ. Введение. Моноциты и макрофаги – клетки, играющие важнейшую роль в работе системы врожденного иммунитета, также могут быть вовлечены в патологический процесс при различных заболеваниях. По этой причине исследование функциональной активности данных клеток *in vitro* представляет большой научный интерес. Литературные данные указывают на большое разнообразие методов, используемых для выделения культуры первичных моноцитов, но применяемые подходы часто оказываются противоречивыми. **Цель.** Провести сравнительный анализ влияния различных условий на эффективность адгезии моноцитов для определения наиболее оптимального сочетания факторов, обеспечивающих наибольший выход и чистоту получаемых клеток. **Материалы и методы.** Периферическую венозную кровь получали от 6 здоровых добровольцев. Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли стандартным методом центрифугирования на градиенте плотности фиколла (1,077 г/мл). После центрифугирования МПК помещали в лунки 24-луночного планшета, покрытые коллагеном либо без покрытия, и инкубировали в течение 2 или 24 часов в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную телячью (FCS) или собственную сыворотку донора (AHS). Число прикрепившихся моноцитов оценивали методом эпифлуоресцентной микроскопии после окраски Hoechst 33342 с автоматическим подсчетом ядер в десяти полях зрения. **Результаты.** Установлено, что инкубация клеток в течение 2 часов в лунках без покрытия в присутствии 10% FCS позволяет получать наибольшее количество моноцитов с чистотой 80,9 (66,5–89,1)%. Число моноцитов, полученных адгезией в коллагенированных лунках имело тенденцию быть ниже, независимо от типа используемой сыворотки. В нашем эксперименте способность моноцитов к адгезии существенно снижалась при использовании комбинации непокрытого пластика и 10% AHS. Пролонгированное до 24 часов время инкубации сопровождалось значимым снижением числа прикрепившихся моноцитов в большинстве случаев. **Заключение.** Инкубация МПК в течение 2 часов на культуральном пластике без покрытия в присутствии 10% FCS обеспечивает наибольший выход и чистоту получаемых моноцитов по сравнению с другими протестированными условиями.

Ключевые слова: моноциты, макрофаги, адгезия, воспаление.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF MONOCYTES ISOLATION CONDITIONS BY ADHESION METHOD FOR *IN VITRO* EXPERIMENTS

D.A.Gassan, O.O.Kotova, D.E.Naumov, I.Yu.Sugaylo, Y.G.Gorchakova, A.A.Sinyuk

Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk,
675000, Russian Federation

SUMMARY. Introduction. Monocytes and macrophages are cells that play an important role in the function of the innate immune system and may be involved in the pathological process in various diseases. For this reason, *in vitro* studies of the functional activity of these cells are of great scientific interest. The literature indicates a large number of methods used to isolate primary monocytes but the approaches are often controversial. **Aim.** To perform a comparative analysis of

Контактная информация

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, Россия, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22; E-mail: e-mail: dani-shi@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Dina A. Gassan, MD, PhD (Med.), Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: e-mail: dani-shi@mail.ru

Для цитирования:

Гассан Д.А., Котова О.О., Наумов Д.Е., Сугайло И.Ю., Горчакова Я.Г., Синюк А.А. Сравнительная характеристика условий выделения моноцитов методом адгезии для экспериментов *in vitro* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2020. Вып.78. С. 128–134. DOI: 10.36604/1998- 5029-2020-78-128-134

For citation:

Gassan D.A., Kotova O.O., Naumov D.E., Sugaylo I.Yu., Gorchakova Y.G., Sinyuk A.A. Comparative characteristics of monocytes isolation conditions by adhesion method for *in vitro* experiments. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2020; (78):128–134 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2020-78-128-134

the influence of various conditions on monocytes adhesion efficiency to determine the most optimal combinations of factors providing the highest yield and purity of the obtained cells. **Materials and methods.** Peripheral venous blood samples were obtained from 6 healthy volunteers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by standard centrifugation on Ficoll density gradient (1.077 g/ml). After the centrifugation, PBMC were plated in wells of a 24-well plate, coated with collagen or uncoated, and incubated for 2 or 24 hours in RPMI-1640 medium containing 10% fetal calf (FCS) or autologous human serum (AHS). The number of attached monocytes was assessed by epifluorescence microscopy after staining with Hoechst 33342 with automatic counting of nuclei in ten fields of view. **Results.** It has been established that incubation of cells for 2 hours in wells without coating in the presence of 10% FCS allows obtaining the largest number of monocytes with median purity of 80.9 (66.5-89.1)%. The number of monocytes obtained by adhesion in collagen-coated wells tended to be lower, regardless of the type of serum used. In our experiment, the adhesion capacity of monocytes was reduced when cells were plated in uncoated wells with 10% AHS. Extended to 24 hours incubation time was accompanied by a significant decrease in the number of attached monocytes in most cases. **Conclusion.** Incubation of PBMC for 2 hours on uncoated tissue culture plastic in the presence of 10% FCS provides the highest yield and purity of monocytes in comparison with other tested conditions.

Key words: monocytes, macrophages, adhesion, inflammation.

Моноциты и макрофаги являются ключевыми клетками, формирующими первичную иммунную защиту организма от микробных патогенов и опухолевых клеток, но одновременно могут быть вовлечены в формирование многих патологических процессов, и потому представляют большой интерес для изучения в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [1]. Известно, что наряду с резидентными популяциями макрофагов, самоподдерживающимися в различных органах и тканях, данные клетки также могут дифференцироваться из моноцитов, вышедших в ткани из периферического кровотока. Макрофаги характеризуются функциональной и структурной гетерогенностью, которая зависит от степени их созревания, локализации и условий микроокружения, в частности, от наличия и концентрации различных активирующих стимулов. Традиционно, активированные макрофаги классифицируют на классические (M1) и альтернативно-активированные (M2). Классические макрофаги представляют собой иммунные эффекторные клетки с реактивным воспалительным фенотипом, они очень агрессивны по отношению к бактериям и производят большое количество лимфокинов. Альтернативно активированные макрофаги являются противовоспалительными, выполняют важную роль в регуляции иммунитета, поддержании иммунологической толерантности и восстановлении тканей, заживлении ран. Макрофаги демонстрируют необычайную пластичность в ответ на эндогенные и экзогенные стимулы [2]. Показано, что M1 макрофаги при определенных условиях могут превращаться в M2 макрофаги и наоборот [3].

Резидентные макрофаги человека трудно выделить из ткани в достаточном количестве, и, кроме того, они плохо пролиферируют в культуре. На этом фоне, макрофаги, полученные из моноцитов, представляют собой удобную альтернативу, поскольку моноциты периферической крови легко доступны для получения в больших количествах и могут быть дифференцированы в макрофаги *in vitro*.

В настоящее время существуют несколько основных способов выделения моноцитов, при этом каждый из них подразумевает выполнение предварительного

этапа для получения мононуклеаров периферической крови (МПК). Начиная с 1968 года с этой целью широко используется метод центрифугирования на градиенте плотности фиколла [4]. Благодаря тому, что среди всех клеток, лимфоциты и моноциты имеют наименьшую плотность ($<1,077$ г/мл), использование фиколла с плотностью 1,077 г/мл позволяет изолировать данные клетки от других форменных элементов крови. Таким образом, после центрифугирования, МПК остаются в верхней фракции, а эритроциты и полиморфно-ядерные нейтрофилы формируют нижние фракции. Учитывая трудоемкость оригинального метода и наличие требований к квалификации персонала, в последнее время были разработаны коммерческие наборы, такие как CPT или SepMate, существенно ускоряющие и облегчающие процесс выделения, прежде всего, за счет использования дополнительных барьеров, исключающих перемешивание МПК с другими клеточными фракциями в процессе выполнения методики [5].

После выделения МПК, следующим этапом производят обогащение фракции моноцитов. На сегодняшний день для этого используют несколько основных подходов, отличающихся друг от друга по степени обогащения, жизнеспособности клеток и стоимости. Среди них: метод обогащения путем адгезии к пластику, метод центрифугирования на градиенте перколлы и метод магнитной сепарации с позитивной или негативной селекцией клеток. Тогда как более совершенные подходы с разделением лимфоцитов и моноцитов с помощью дополнительного центрифугирования с перколлом или магнитной сепарации отличаются высокой чистотой получаемых клеток [6,7], обогащение методом адгезии является более доступным ввиду минимальных финансовых затрат [8]. Тем не менее, результативность выделения моноцитов методом адгезии к пластику подвержена существенной вариабельности в зависимости от условий, включая тип используемого пластика, наличие различных покрытий (сыворотка, фибронектин, желатин, коллаген) либо их отсутствие, тип сыворотки и время инкубации. Учитывая данный факт, целью настоящего исследования был сравнительный анализ условий адгезии моно-

цитов для определения наиболее оптимального сочетания факторов, обеспечивающих наибольший выход и чистоту получаемых клеток.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены шесть здоровых добровольцев в возрасте 26-35 лет. При проведении исследования руководствовались принципами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2013 г. и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом №200н от 01.04.2016 МЗ РФ. Все лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике.

Венозную кровь в объеме 9 мл собирали в вакуумные пробирки, содержащие K_3 ЭДТА. Для изоляции лейкоцитов, кровь предварительно центрифугировали в течение 15 минут при 1000g. Лейкоцитарные клетки в объеме около 3 мл переносили в стерильную центрифужную пробирку. К отобраным клеткам добавляли фосфатно-солевой буфер (ФСБ) до конечного объема 9 мл и перемешивали. В новой пробирке объемом 15 мл полученную суспензию медленно наслаивали на 3 мл фиколла с плотностью 1,077 г/мл (ООО «Биолот», Россия), и затем центрифугировали при 400g в течение 40 минут при температуре 23°C. Верхнюю часть плазмы удаляли, оставляя над интерфазой, содержащей МПК, 1-2 мл. Через оставшийся слой плазмы в стерильную коническую пробирку объемом 15 мл отбирали МПК. Для удаления тромбоцитов полученные клетки трижды отмывали, добавляя стерильный ФСБ до полного объема пробирки, и осаждавая центрифугированием при 150g 10 минут. После третьей отмывки супернатант декантировали и ресуспендировали осадок в 1 мл среды RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Германия). Подсчет клеток и оценку жизнеспособности с трипановым синим выполняли на автоматическом счетчике Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Полученные клетки рассевали в лунки 24-луночного культурального планшета (Corning Inc., США), содержащие 500 мкл RPMI-1640 с 1% пенициллина/стрептомицина, в количестве 5×10^5 клеток на лунку. В ходе эксперимента тестировали влияние различных комбинаций таких факторов, как тип сыворотки (10% эмбриональная телячья (FCS) либо аутологичная сыворотка (AHS)), наличие коллагенового покрытия лунок и время инкубации (2 и 24 часа), на адгезию клеток. В экспериментах использовали инактивированную нагреванием до 56°C в течение 30 минут FCS и нативную AHS, полученную центрифугированием при 2300g в течение 15 минут цельной крови, отобранной в вакуумные пробирки с активатором свертывания. Раствор коллагена I типа (ООО «Биолот», Россия) вно-

сили в лунки в конечной концентрации 0,5 мг/мл в объеме 300 мкл, выдерживали 2 часа при 37°C, после чего раствор удаляли, а лунки высушивали в ламинарном шкафу и трижды промывали ФСБ. Клетки выдерживали в инкубаторе CB53 (Binder, Германия) при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 в течение 2 или 24 часов.

После окончания инкубации прикрепившиеся клетки дважды отмывали ФСБ, после чего окрашивали ядра красителем Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США) в концентрации 5 мкг/мл в течение 10 минут. Микроскопию выполняли с помощью системы визуализации EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме эпифлуоресценции на канале DAPI при 10× увеличении. Подсчет клеток в каждой лунке проводили в десяти полях зрения в автоматическом режиме с помощью встроенного программного обеспечения. Благодаря более крупному размеру ядер моноцитов было возможно проводить их отдельный подсчет, исключая контаминирующие лимфоциты. Данный способ был предварительно верифицирован методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с окраской клеток моноклональными антителами к CD14, конъюгированными с FITC (Becton Dickinson, США).

Статистические расчеты выполняли в программном пакете Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные представлены в формате Me (Q1-Q3) – медиана и межквартильный интервал. Оценку значимости межгрупповых различий для количественных переменных выполняли с помощью критерия U Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Жизнеспособность клеток после выделения во всех случаях составляла более 95%. Экспериментально было установлено, что пролонгированная инкубация в течение 24 часов не сопровождается увеличением числа прикрепившихся моноцитов. Напротив, при любых условиях, кроме инкубации в лунках без покрытия в присутствии AHS, количество прикрепленных клеток достоверно снижалось спустя 24 часа. При этом инкубация в лунках без покрытия в присутствии AHS не сопровождалась значимым изменением эффективности прикрепления клеток в зависимости от времени (рис. 1).

Количество моноцитов после инкубации в течение 2 часов с 10% FCS в лунках без покрытия имело тенденцию быть выше, по сравнению с коллагенированными лунками, содержащими 10% FCS (599,0 (469,0-909,0) против 540,0 (285,0-787,0), $p=0,1$), а также в сравнении с коллагенированными лунками, содержащими 10% AHS (599,0 (469,0-909,0) против 532,0 (318,0-772,0), $p=0,09$). При этом, в случае наличия коллагенового покрытия, тип используемой сыворотки не играл роли – число моноцитов в соответствующих лунках было приблизительно одинаковым. Вне зависимости от времени инкубации, в лунках без покрытия,

содержащих 10% AHS, отмечалось существенно меньшее количество клеток, в сравнении с прочими экспериментальными условиями.

Процент моноцитов среди общего числа прикрепившихся клеток также значимо снижался при пролонгированной инкубации, за исключением лунок без покрытия, содержащих 10% AHS, где он оставался стабильно низким, вне зависимости от времени (рис. 2).

Наиболее высокое относительное содержание моноцитов обнаруживалось в лунках без покрытия, содержащих 10% FCS (80,9 (66,5-89,1)%), тогда как в коллагенированных лунках, содержащих 10% FCS или AHS, а также в лунках без покрытия с 10% AHS доля моноцитов была значимо ниже (66,9 (57,2-83,1)%, $p=0,004$; 59,5 (48,4-74,6)%, $p<0,001$; 47,2 (34,7-82,9)%, $p<0,001$, соответственно).

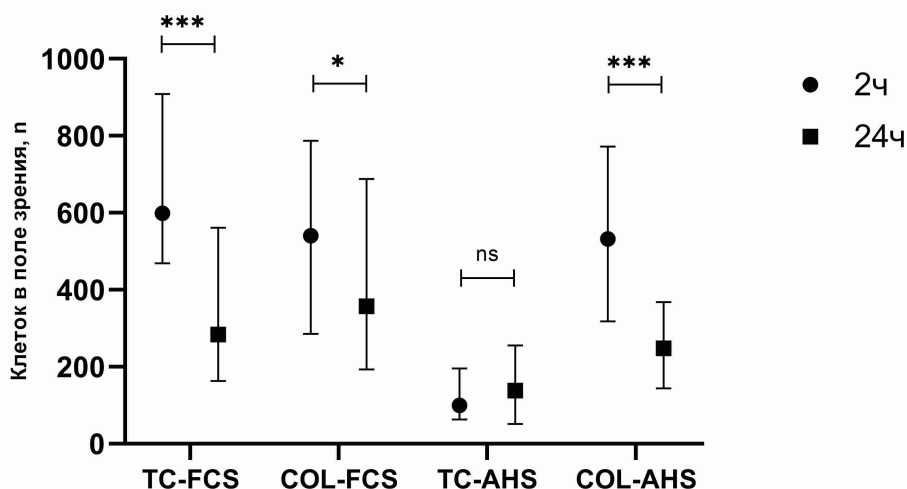


Рис. 1. Абсолютное количество прикрепившихся моноцитов в поле зрения спустя 2 и 24 часа инкубации в непокрытых лунках (TC) либо в лунках, покрытых коллагеном (COL), в присутствии 10% эмбриональной телячьей (FCS) либо аутологичной (AHS) сыворотки. Значимость различий: * – $p<0,05$, *** – $p<0,001$, ns – $p>0,05$.

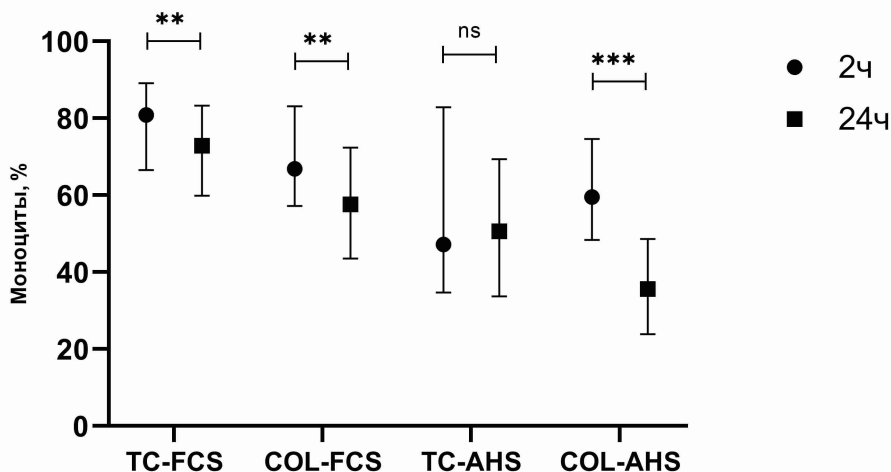


Рис. 2. Относительная доля моноцитов среди всех прикрепившихся клеток в поле зрения спустя 2 и 24 часа инкубации в непокрытых лунках (TC) либо в лунках, покрытых коллагеном (COL), в присутствии 10% эмбриональной телячьей (FCS) либо аутологичной (AHS) сыворотки. Значимость различий: ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$, ns – $p>0,05$.

Таким образом, мы подтвердили, что традиционные условия выделения моноцитов методом адгезии являются наиболее оптимальными. Двухчасовой инкубации МПК в непокрытых лунках, содержащих среду с 10% FCS, достаточно для получения наибольшего числа моноцитов с приемлемой чистотой, в сравнении с прочими протестированными условиями. Тем не менее, в литературных данных встречаются свидетель-

ства о преимуществах альтернативных протоколов адгезионного выделения моноцитов. Так, M.Saghaeian-Jazi et al. [9] практиковали адгезию моноцитов в лунках, покрытых желатином или плазмой крови в присутствии 0,5% инактивированной аллогенной человеческой сыворотки. Дальнейшее культивирование клеток в среде, содержащей 10% инактивированную человеческую сыворотку от донора с IV(AB) группой

крови в наименьшей степени влияло на жизнеспособность клеток, по сравнению со средой с добавлением 10% FCS. В работе D.Schmidt et al. [10] авторы также исследовали вопрос потенциального влияния ксено-протеинов FCS на способность моноцитов к адгезии. В результате было установлено, что использование 10% AHS, по сравнению с 10% нативной FCS, улучшает адгезию на активированном полистироле в 3 раза и в 8-10 раз на гидрогеле из полиэтиленгликоля. Данные различия отмечались как после 2, так и после 24 часов инкубации. В настоящее время не существует однозначного мнения о необходимости температурной инактивации FCS перед использованием. В теории, потребность в проведении инактивации обусловлена содержанием в сыворотке компонентов системы комплемента, негативно влияющих на жизнеспособность клеток. Однако, по некоторым данным, содержание комплемента в FCS достаточно мало, чтобы вызвать значимые эффекты. Кроме того, нагревание может приводить к разрушению полезных факторов и нутриентов, необходимых для клеточного роста [11]. Тем не менее, в ходе выполнения предварительных экспериментов нами было установлено, что использование нативной FCS сопровождается появлением признаков клеточной деструкции и апоптоза. Таким образом, не исключено, что выявленные различия могли являться следствием негативного влияния не инактивированной FCS, а не отражать действительные преимущества аутологичной сыворотки.

Y.Коуама et al. [12] исследовали влияние различных покрытий на прикрепление макрофагов, дифференцированных из монобластов U937 в присутствии 10% FCS и форбол-12-миристинат-13-ацетата. Результат оценивали через 1 и 3 дня. Как и в настоящей работе, наилучшей была адгезия макрофагов к пластику без покрытия. Средняя степень адгезии отмечалась при покрытии лунок бычьим сывороточным альбумином или фибронектином. При этом коллагеновый субстрат препятствовал прочному прикреплению клеток вне зависимости от типа коллагена – клетки формировали агрегаты и легко смывались пипетированием. В другом исследовании была выполнена оценка эффективности адгезии моноцитов на коллагеновые субстраты в краткосрочной динамике [13]. В отличие от вышеприведенной работы, авторы регистрировали ход процесса в бессывороточных условиях и обнаружили ускоренную динамику прикрепления моноцитов к коллагену с выходом на плато приблизительно через 1 час, тогда как в контрольных лунках, покрытых бычьим сывороточным альбумином, плато с аналогичным уровнем адгезии достигалось лишь через 3 часа. Также было установлено, что взаимодействие моноцитов с коллагеном опосредовано интегрином $\alpha X\beta 2$, состоящим из

субъединиц CD11c и CD18. Определенное влияние на эффективность адгезии моноцитов к коллагену может играть возраст донора. В экспериментальной модели с использованием полимерных микрофлюидных ячеек изучали эффективность адгезии суспензии моноцитов в среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS [14]. При этом, моноциты, полученные от доноров старшей возрастной группы (44-73 года), демонстрировали значимо лучшую адгезию к коллагену, по сравнению с клетками более молодых лиц (24-36 лет). Независимо от возраста, число прикрепившихся клеток было выше в камерах с коллагеновым покрытием, чем в непокрытых ячейках.

Как видно, проблема изучения способности к адгезии моноцитов и макрофагов в зависимости от различных условий далека от своего окончательного решения. Исследования, выполненные в данной области, отличаются крайне разнообразным экспериментальным дизайном – объектом исследования выступают как клеточные линии, так и первичные клетки, выделение которых производят различными способами. Вариабельность в результаты экспериментов также, по-видимому, вносит разный возраст доноров, тип используемого пластика, индивидуальные особенности биохимического состава используемой сыворотки. В настоящем исследовании мы установили, что использование культурального пластика без покрытия с одновременным добавлением в среду 10% инактивированной FCS, является наиболее предпочтительным для выделения моноцитов методом адгезии с точки зрения количества и чистоты получаемой популяции клеток. Использование коллагенового покрытия нивелирует эффекты от использования различных типов и сопровождается некоторым снижением количества прикрепившихся клеток. Использование среды с 10% AHS без коллагенового субстрата не рекомендуется, поскольку не обеспечивает надежной адгезии клеток для последующего культивирования. Двухчасовая инкубация является достаточной для адгезии моноцитов из суспензии МПК, продолжительное время инкубации (24 часа) приводит к самопроизвольному откреплению клеток и снижению эффективности метода.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Источники финансирования

Исследование проводилось без участия спонсоров

Funding Sources

This study was not sponsored

ЛИТЕРАТУРА

1. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets // Nat. Rev. Immunol. 2011. Vol.11, №11. P.723–737. doi: 10.1038/nri3073

2. Bikash T., Keunwook L. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis // *BMB Rep.* 2019. Vol.52, №6. P.360–372. doi: 10.5483/BMBRep.2019.52.6.140
3. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015. Vol.53, №5. P.676–88. doi: 10.1165/rcmb.2015-0012OC
4. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968. Vol.97. P.77–89.
5. Grievink H.W., Luisman T., Kluft C., Moerland M., Malone K.E. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality // *Biopreserv. Biobank.* 2016. Vol.14, №5. P.410–415. doi: 10.1089/bio.2015.0104
6. Nielsen M.C., Andersen M.N., Møller H.J. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro // *Immunology.* 2020. Vol.159, №1. P.63–74. doi: 10.1111/imm.13125
7. Meital L.T., Coward A.S., Windsor M.T., Bailey T.G., Kuballa A., Russell F.D. A simple and effective method for the isolation and culture of human monocytes from small volumes of peripheral blood // *J. Immunol. Methods.* 2019. Vol.472. P.75–78. doi: 10.1016/j.jim.2019.04.005
8. Treves A.J., Yagoda D., Haimovitz A., Ramu N., Rachmilewitz D., Fuks Z. The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension // *J. Immunol. Methods.* 1980. Vol.39, №1-2. P.71–80. doi: 10.1016/0022-1759(80)90295-1
9. Saghaeian-Jazi M., Mohammadi S., Sedight S. Culture and Differentiation of Monocyte Derived Macrophages Using Human Serum: An Optimized Method // *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 2016. Vol.18, №6. P.e7362. doi: 10.17795/zjrms-7362.
10. Schmidt D., Joyce E.J., Kao W.J. Fetal bovine serum xenoproteins modulate human monocyte adhesion and protein release on biomaterials in vitro // *Acta Biomater.* 2011. Vol.7, №2. P.515–525. doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.022
11. Look N. Heat inactivation – are you wasting your time? // *Art to Science (HyClone Newsletter).* 1996. Vol.15. P.1–5.
12. Koyama Y., Norose-Toyoda K., Hirano S., Kobayashi M., Ebihara T., Someki I., Fujisaki H., Irie S. Type I collagen is a non-adhesive extracellular matrix for macrophages // *Arch. Histol. Cytol.* 2000. Vol.63, №1. P.71–79. doi: 10.1679/aohc.63.71
13. Garnotel R., Rittié L., Poitevin S., Monboisse J.C., Nguyen P., Potron G., Maquart F.X., Randoux A., Gillery P. Human blood monocytes interact with type I collagen through $\alpha_x \beta_2$ integrin (CD11c-CD18, gp150-95) // *J. Immunol.* 2000. Vol.164, №11. P.5928–5934. doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5928
14. Khalaji S., Zondler L., KleinJan F., Nolte U., Mulaw M.A., Danzer K.M., Weishaupt J.H., Gottschalk K.E. Age Increases Monocyte Adhesion on Collagen // *Sci. Rep.* 2017. Vol.7. P.46532. doi: 10.1038/srep46532

REFERENCES

1. Murray P.J., Wynn T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11(11):723–737. doi: 10.1038/nri3073
2. Bikash T., Keunwook L. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Rep.* 2019; 52(6):360–372. doi: 10.5483/BMBRep.2019.52.6.140
3. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2015; 53(5):676–88. doi: 10.1165/rcmb.2015-0012OC
4. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 97:77–89.
5. Grievink H.W., Luisman T., Kluft C., Moerland M., Malone K.E. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreserv. Biobank.* 2016; 14(5):410–415. doi: 10.1089/bio.2015.0104
6. Nielsen M.C., Andersen M.N., Møller H.J. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages in vitro. *Immunology* 2020; 159(1):63–74. doi: 10.1111/imm.13125
7. Meital L.T., Coward A.S., Windsor M.T., Bailey T.G., Kuballa A., Russell F.D. A simple and effective method for the isolation and culture of human monocytes from small volumes of peripheral blood. *J. Immunol. Methods* 2019; 472:75–78. doi: 10.1016/j.jim.2019.04.005
8. Treves A.J., Yagoda D., Haimovitz A., Ramu N., Rachmilewitz D., Fuks Z. The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension. *J. Immunol. Methods* 1980; 39(1-2):71–80. doi: 10.1016/0022-1759(80)90295-1

9. Saghaeian-Jazi M., Mohammadi S., Sedight S. Culture and Differentiation of Monocyte Derived Macrophages Using Human Serum: An Optimized Method. *Zahedan J. Res. Med. Sci.* 2016; 18(6):e7362. doi: 10.17795/zjrms-7362
10. Schmidt D., Joyce E.J., Kao W.J. Fetal bovine serum xenoproteins modulate human monocyte adhesion and protein release on biomaterials in vitro. *Acta Biomater.* 2011; 7(2):515–525. doi: 10.1016/j.actbio.2010.08.022
11. Look N. Heat inactivation – are you wasting your time? Art to Science (HyClone Newsletter) 1996; 15:1–5.
12. Koyama Y., Norose-Toyoda K., Hirano S., Kobayashi M., Ebihara T., Someki I., Fujisaki H., Irie S. Type I collagen is a non-adhesive extracellular matrix for macrophages. *Arch. Histol. Cytol.* 2000; 63(1):71–79. doi: 10.1679/aohc.63.71
13. Garnotel R., Rittié L., Poitevin S., Monboisse J.C., Nguyen P., Potron G., Maquart F.X., Randoux A., Gillery P. Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J. Immunol.* 2000; 164(11):5928–5934. doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5928
14. Khalaji S., Zondler L., KleinJan F., Nolte U., Mulaw M.A., Danzer K.M., Weishaupt J.H., Gottschalk K.E. Age Increases Monocyte Adhesion on Collagen. *Sci. Rep.* 2017; 7:46532. doi: 10.1038/srep46532

Информация об авторах:

Дина Анатольевна Гассан, канд. мед. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: dani-shi@mail.ru

Олеся Олеговна Котова, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Денис Евгеньевич Наумов, канд. мед. наук, зав. лабораторией, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: denn1985@bk.ru

Ивана Юрьевна Сугайло, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: ivanka_888@mail.ru

Яна Геннадьевна Горчакова, лаборант-исследователь, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com

Анастасия Андреевна Синюк, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: amur.asua@gmail.com

Author information:

Dina A. Gassan, MD, PhD (Med.), Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: dani-shi@mail.ru

Olesya O. Kotova, MD, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: foxy_voxy_on@mail.ru

Denis E. Naumov, MD, PhD (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: denn1985@bk.ru

Ivana Yu. Sugaylo, Assistant Researcher, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: ivanka_888@mail.ru

Yana G. Gorchakova, Assistant Researcher, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: yana.janet.gorchakova@gmail.com

Anastasia A. Sinyuk, MD, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: amur.asua@gmail.com

Поступила 16.11.2020
Принята к печати 30.11.2020

Received November 16, 2020
Accepted November 30, 2020