

ПРИМЕНИМОСТЬ МЕТОДОВ ИЗОЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Солнцев В.А., Плотницкий Р.В., Маркелов В.А., Корокозова Т.В., Витковский С.В.,
Данилко К.В.

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Институт фундаментальной медицины, Уфа, e-mail: kse-danilko@yandex.ru

Моноцитарная фракция является привлекательным объектом для изучения обширной области врожденного иммунитета и патогенеза различных заболеваний. На данный момент не существует единого установленного метода для извлечения клеток в клинической практике. В данном обзоре было отобрано 120 источников из следующих баз данных: Scispace - 100, Elsevier - 15, Pubmed Central - 5 источников соответственно. Из них для составления таблицы сравнения отобраны 10, 2 и 1 статья соответственно. Данные по сравнению методик изоляции моноцитов представлены по ряду критериев: чистоте изолируемой популяции, количеству выделенных клеток, их жизнеспособности, времени выделения и способности к иммунному ответу. Высокая чистота и жизнеспособность при сохранении иммунного ответа моноцитов в клинической практике доступна при применении разделения на градиенте плотности (Ficoll и Percoll), в том числе с использованием коммерческих наборов Cell Preparation Tube и SepMate. Применение магнитной сортировки клеток и флуоресцентной сортировки клеток затруднено за пределами научно-исследовательской лаборатории, поскольку требует долговременной пробоподготовки, дорогостоящих реагентов и оборудования. Изоляция моноцитов с помощью адгезии также применима в клинических условиях, но снижает иммунный ответ клеток и обеспечивает провоспалительный ответ за счет низкой чистоты образца. Возможным методом извлечения для клинических условий может стать сортировка клеток на основе плавучести, однако данный метод не апробирован на моноцитах. Для клинической практики наиболее применимым методом изоляции моноцитов можно назвать разделение методом центрифугирования в градиенте фиколла и перколла, в том числе с использованием коммерческих наборов (SepMate и Cell Preparation Tube).

Ключевые слова: моноциты, изоляция клеток, клиническая диагностика.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства БГМУ «Приоритет-2030».

APPLICABILITY OF MONOCYTE ISOLATION METHODS IN CLINICAL PRACTICE

Solntsev V.A., Plotnitsky R.V., Markelov V.A., Korokozova T.V., Vitkovsky S.V.,
Danilko K.V.

Bashkir State Medical University, Institute of Fundamental Medicine, Ufa, e-mail: kse-danilko@yandex.ru

The monocyte fraction is an attractive target for studying the vast field of innate immunity and the pathogenesis of various diseases. At present, there is no single established method for cell extraction in clinical practice. In this review, 120 sources were selected from the following databases: Scispace - 100, Elsevier - 15, Pubmed Central - 5 sources, respectively. Of these, 10, 2 and 1 articles were selected for the comparison table, respectively. The data on comparison of monocyte isolation techniques are presented according to a number of criteria: purity of the isolated population, number of isolated cells, their viability, isolation time and ability to immune response. High purity and viability with preservation of the immune response of monocytes in clinical practice is available with the use of density gradient separation (Ficoll and Percoll), including the use of commercial kits Cell Preparation Tube and SepMate. The application of magnetic cell sorting and fluorescent cell sorting is difficult outside the research laboratory as it requires long-term sample preparation, expensive reagents and equipment. Monocyte isolation by adhesion is similarly applicable in clinical settings, but reduces the immune response of cells and provides a pro-inflammatory response due to low sample purity. Cell sorting based on buoyancy may be a possible extraction method for clinical conditions, but this method has not been tested on monocytes. For clinical practice, the most applicable method of monocyte isolation is separation by centrifugation in a ficoll and percoll gradient, including the use of commercial kits (SepMate and Cell Preparation Tube).

Keywords: monocytes, cell isolation, clinical diagnosis, magnetic-activated cell sorting, fluorescence-activated cell sorting.

The work was carried out with the support of the BSMU Strategic Academic Leadership Program "Priority-2030".

Введение

В области клеточной биологии изоляция моноцитов является важной задачей, так как эти клетки играют ключевую роль в первичном иммунном ответе и патогенезе различных заболеваний. Моноциты и макрофаги, например, участвуют в ремоделировании тканей, а дендритные клетки имеют огромное значение при формировании иммунного ответа и распознавании опухолевых клеток. Модификация моноцитарных и макрофагальных популяций клеток может применяться для создания онковакцин [1].

Перспектива применения мононуклеарных фагоцитов для таких направлений, как терапия рака или атеросклероза, делает изоляцию моноцитов необходимой в условиях клиники. Однако методы выделения часто сложны, продолжительны по времени и требуют подготовленного специалиста. В связи с этим возникает потребность выявить методы, доступные для клинической лаборатории, и продвинутые методы, применимые в условиях исследовательских лабораторий.

Цель исследования - провести обзор научных статей с использованием баз данных Scispace, Pubmed Central, Sciencedirect, Elibrary и проанализировать результаты исследований по методам изоляции моноцитов для сравнения их по сложности и продолжительности выполнения, чистоте популяции клеток, количеству клеток и их жизнеспособности.

Материалы и методы исследования. Для составления обзора использовали рекомендации в статье [2]. По запросу «monocyte isolation method comparison» в базе данных Scispace было получено 100 статей, из которых для анализа было отобрано 11. Из базы Sciencedirect по тому же запросу отобрано 15 источников, взято в анализ 2. Из базы Pubmed Central по тому же запросу отобрано 5 источников, взято в анализ 1. Из базы Elibrary по запросу «выделение моноцитов» отобрано 5 источников, взято в анализ 1. Критерии для исключения: год написания статьи до 2009, методика эксперимента не направлена на извлечение моноцитов и не содержит данные по их жизнеспособности, чистоте популяции и количеству выделенных клеток, дублирование статьи. Для составления группы сравнения методов изоляции с помощью Ficoll и Percoll была включена статья после 2000 года по причине отсутствия подобных статей после 2009 года.

Результаты исследования и их обсуждение

Моноциты

Наиболее часто применимыми на практике методами изоляции моноцитов являются флуоресцентная сортировка клеток (FACS - fluorescence-activated cell sorting) и магнитная сортировка клеток (MACS - magnetic-activated cell sorting). Данные методы требуют для проведения соблюдения многоэтапного протокола, а также дорогостоящих компонентов и оборудования, что чаще всего недоступно для условий клинических лабораторий.

Метод флуоресцентной сортировки основан на использовании флуоресцентных антител, которые связываются с определенными антигенами на поверхности клеток. Данный метод наиболее точен, способен анализировать весь объем клеток вплоть до единичных клеток, а также дает возможность получать чистые популяции моноцитов. Кроме того, он предоставляет возможность настройки для оптимизации извлечения клеток в зависимости от применяемых условий.

Однако, помимо своих преимуществ, метод имеет значительные недостатки. Ключевым недостатком метода является его продолжительность, поскольку на сортировку клеток одного образца уходит от 1,5 до 2 часов. Кроме того, происходит снижение жизнеспособности клеток при выделении микроглии и астроцитов при помощи FACS, что может быть связано с механической деформацией клеток в сопле цитометра [3]. Сравнительные данные представлены в таблице. Иные выводы можно сделать, основываясь на профиле экспрессии генов. Согласно им, моноклеары, выделяемые методом FACS, создают меньшее количество факторов стресса и, следовательно, могут быть более жизнеспособны в сравнении с клетками, выделенными иными методами [4]. Таким образом, снижение жизнеспособности моноцитов после выделения по методу FACS остается дискуссионным вопросом.

Сравнение методов изоляции моноцитов и дифференцированных
моноклеарных фагоцитов

Метод изоляции	Выход клеток	Чистота	Жизнеспособно сть	Время выделения	Иммунный ответ	Источн ик
FACS	117 тыс. клеток микроглии/мозг мышы	>90%;	>85%	1.5-2 ч	НД	[3]
MACS	70 тыс. клеток микроглии/мозг мышы	>90%	>90%	0.42-0.5 ч	НД	[3]
	2 млн клеток из 6 мл цельной крови; 10 млн клеток из 4,75 мл лейкоцитарной пленки	99%	99%	0,5 ч	TACS (traceless affinity cell sorting - сортировка клеток бесследной аффинностью) вызывал больший ответ цитокина TNF моноцитов на LPS (липополисахарид); разницы в экспрессии IL6 в ответ на LPS не замечено между TACS и MACS	[5]
	65-98 тысяч дендритных клеток/10-15 млн PBMC (peripheral blood	НД	89,66±10,4%	0,5 ч	1,5% дендритных клеток были способны к фагоцитозу; 11% фагоцитирующих	[6]

	mononuclear cell - мононуклеарны е клетки периферическо й крови)				клеток, по данным Cell Quest	
	НД	90%	>95%	1 ч	НД	[7]
	14,5-19,5 млн моноцитов	85%	97%	1 ч	При положительной селекции - снижение экспрессии моноцитарных маркеров CD14 и CD163 в два раза; снижение CD163 в 1,5 раза при негативной селекции	[8]
	220±30 тыс. клеток/мл крови	98,5±0,4% (по ложител ьная селекция) 97±0,7% (негативна я селекция)	99%	2,5 ч (положительн ая селекция) 3 ч (негативная селекция)	Различий в фагоцитозе между моноцитами после положительной или негативной сортировки не выявлено	[9]
	25% (количество моноцитов после выделения от количества PBMC)	НД	87±2,75%	0,5 –1 ч	НД	[10]
	25±3,2% (количество моноцитов после выделения от количества PBMC)	94,98±1,9%	94,94±1,91%	НД	Повышение интерферона гамма IFN γ в 3 раза при активации дендритных клеток суспензией клеток линии MCF-7	[11]
	НД	95-99%	НД	0,5-1 ч	НД	[12]
Ficoll	600 тысяч клеток/мл цельной крови	7-10% (количество моноцитов в общем количестве PBMC)	100%	0,5-1 ч	Сниженный иммунный ответ на антиген	[13]
	70% от исходного количества клеток	70%	НД	НД	НД	[14]
	19,53±4,87 млн клеток (32,62% моноцитов от общего количества клеток PBMC)	74,75±3,84	НД	2 ч	НД	[15]
Percoll	НД	50-60%	50%	НД	НД	[16]

	70% от исходного количества клеток	70%	НД	НД	НД	[14]
Ficoll/Percol II	4 млн моноцитов/ 30 мл цельной крови	70%	95%	1,5 ч	Клетки способны к фагоцитозу, TNF повышен в 500 раз, IL6 – в 75 раз в ответ на LPS в сравнении с нестимулированны ми клетками	[17]
	150±40 млн моноцитов/400 мл крови	НД	НД	2 ч	Повышение экспрессии после дифференциации IL6 – в 600 раз, TNF - в 100 раз в ответ на LPS	[18]
	НД	60-80%	НД	1,5 ч	НД	[12]
Адгезия	57-85 тысяч дендритных клеток/10-15 млн PBMC	НД	88,66±8,08%	2 ч	8% дендритных клеток способны к фагоцитозу; 2% фагоцитирующих клеток, по данным Cell Quest	[6]
	500-900 клеток в 10 полях зрения	60-80%	<95%	2 ч	НД	[7]
	15% моноцитов от общего числа клеток PBMC	87-95%	<98%	3 ч (16 ч)	НД	[19]
	2,5 млн клеток моноцитов	44%	90%	1 ч	Снижение экспрессии CD14 в два раза, повышение мембранного белка HLA-DR в два раза; снижение CD163 в два раза	[8]
	190±60 тыс. клеток/мл крови	67,3±3,6%	99%	4 ч	НД	[9]
	6.2% (количество клеток в общем количестве PBMC)	НД	91.75±1.66%	2 ч	НД	[10]
	НД	75-90%	НД	1 ч	НД	[12]
CPT/SepMate	800 - 1300 тысяч клеток/мл цельной крови	4-12% (количество моноцитов в общем количестве PBMC)	100%	0,5-1 ч	Повышенный иммунный ответ на антиген (выше, чем при выделении градиентом фиколла)	[13]

Альтернативным методом можно считать магнитную сортировку клеток (MACS). Отличительной особенностью данного метода является связывание парамагнитных наночастиц с антителом, прикрепляющимся к антигену на поверхности моноцитов. Высокая

процессивность, возможность выделения большого числа меченых клеток в сравнительно короткие сроки (~30 мин.) делает данный метод широко применяемым в исследовательских лабораториях. Ограничением данного метода можно назвать аффинность частиц к моноцитам, что может изменять активацию моноцитов после изоляции на предъявляемый антиген. Например, Weiss и соавт. [5] наблюдали снижение экспрессии гена TNF (фактора некроза опухоли) в ответ на предъявление LPS (липополисахарида) у MACS-сепарированных клеток в сравнении с TACS (traceless affinity cell sorting - сортировка клеток бесследной аффинностью) при сопоставимом уровне экспрессии IL-6 (интерлейкина 6) между моноцитами, выделенными методами MACS и TACS. Также было показано, что клетки, выделенные по методу негативной изоляции, в сравнении с подвергшимися положительной селекции, делились активнее и достигали максимума численности при внесении LPS после 16 ч инкубирования [20]. Кроме того, связывание CD14-положительных клеток с антителами сопряжено с избыточной флуоресценцией моноцитов и снижением фагоцитирующей активности [6]. Все эти данные указывают на снижение иммунного ответа клеток, изолированных при использовании положительной селекции.

Метод разделения на градиенте плотности (например, с использованием Percoll (перколл) или Ficoll (фиколл)) представляет собой более доступную альтернативу MACS и FACS. Кровь или суспензия клеток в фосфатно-солевом буфере, содержащая лейкоциты, наслаивается на слой разделяющего раствора. Наиболее известно разделение в градиенте фиколла. В данном методе гранулоциты совместно с эритроцитами в составе суспензии клеток или крови при центрифугировании оседают на дне под фиколлом, тогда как моноциты и лимфоциты остаются на границе между фосфатно-солевым буфером и фиколлом. Перколл имеет более высокую плотность, а потому при разделении смеси моноцитов и лимфоцитов последние оседают на дне. Использование мембраны [21], а также комбинирование двух градиентов - фиколла и перколла [17] - позволяет достигнуть наибольшей чистоты образца для дальнейших исследований. Совместное использование фиколла и перколла часто применяется при изоляции нейтрофилов [22], но также может быть применено и для извлечения моноцитарно-лимфоцитарной фракции.

В клинической практике выбор метода изоляции моноцитов также зависит от времени. Часто отсутствие возможности долгой и трудоемкой работы по выделению моноцитов приводит к замене самостоятельного наслаивания на применение альтернатив, таких как CPT (Cell Preparation Tube) и SepMate. Использование данных пробирок менее трудоемко и доступно для применения в клинике. Данный подход увеличивает количество выделенных клеток по сравнению с методом разделения на градиенте плотности фиколла и способствует сохранению нативного иммунного ответа [13]. Тем не менее выделенные клетки должны использоваться в течение суток после выделения, так как даже с использованием готовых

решений жизнеспособность клеток резко снижается после выдерживания в течение суток и более [23].

Одно из свойств моноцитов - адгезия - также может применяться для изоляции моноцитов. Адгезивная поверхность планшета или флакона для культивирования и фетальная бычья сыворотка в составе среды является оптимальным условием для изоляции [6]. Определенные методики подготовки образцов к адгезии позволяют получать чистоту популяции моноклеаров на уровне с магнитной сортировкой, например предварительное покрытие флакона фетальной бычьей сывороткой [19], однако в большинстве методик адгезия незначительно снижает количество лимфоцитов в выделенном образце [7; 8]. Помимо этого, большим недостатком данного метода является долгое время инкубирования - от 2 до 16 ч.

В клинической лаборатории также применимо разделение клеток за счет связывания полых микрочастиц со связанными антителами с клетками [24; 25]. Разделение клеток по плавучести может стать заменой применения контрастных веществ, изменяющих свойства клеток. Однако на данный момент нет исследований по извлечению моноцитов данным методом. Кроме того, необходимо выяснить, способны ли данные комплексы изменять иммунный ответ моноклеаров на антиген.

Таким образом, метод изоляции моноцитов может существенно влиять на иммунный ответ клеток. Так, в исследованиях было показано, что магнитная сортировка усиливает флуоресценцию клеток, но при этом снижает иммунный ответ дендритных клеток [6]. При положительной селекции микробусины остаются плотно прикреплены к поверхности моноцитов, что изменяет иммунный ответ в присутствии антигена [20]. Положительная селекция в магнитной сортировке может значительно снижать иммунный ответ моноцитов на предъявление антигена [6; 8; 20]. Негативная селекция позволяет сохранить популяцию классических моноцитов интактно, но значительно изменяет итоговую популяцию по сравнению с PBMC (peripheral blood mononuclear cell - моноклеарные клетки периферической крови) из-за удаления промежуточных и неклассических моноцитов. Выделение методом адгезии незначительно снижает загрязнение лимфоцитами, что может проявляться в более провоспалительном фенотипе выделенных этим методом моноцитов [8].

Дифференциация в макрофаги и дендритные клетки

Дифференциация моноцитов является перспективным способом получения макрофагов и дендритных клеток, способных модулировать патологические изменения ткани при различных заболеваниях. Исследование моноклеарных фагоцитов, в частности макрофагов, демонстрирует сложную картину дифференциации и поляризации моноцитов, которая существенно влияет на их функциональные свойства и участие в иммунных процессах. Ключевым аспектом является понимание того, как различные стимулы формируют фенотипы макрофагов. Независимо от метода выделения, стимуляция LPS + IFN γ (интерферон

гамма) сопровождается появлением клеток с M1-подобным провоспалительным фенотипом. Стимуляция IL-4 + IL-13 приводит к формированию M2a-подобного фенотипа с повышенной экспрессией мРНК и мембранного белка CD206. Наконец, стимуляция IL-10 приводит к появлению клеток с M2c-подобным фенотипом с повышенной экспрессией мРНК и мембранного белка CD163 [8].

Процесс получения чистой популяции макрофагов затруднен присутствием лимфоцитов и тромбоцитов в изолированной популяции. Присутствие тромбоцитов при отрицательной селекции [4; 16] может изменять дифференцировку макрофагов в сторону противовоспалительного фенотипа. Несмотря на снижение количества тромбоцитов в процессе созревания, оно сопровождается высокой экспрессией CD163 у данных образцов, что подтверждает изменение фенотипа. Изменение свойств клеток под воздействием иных клеток крови способно изменить фенотипические свойства изолированной популяции, что может привести к снижению репрезентативности результатов.

Процесс негативной селекции сопровождается разделением большого числа частиц, сопоставимых по размерам с клетками, отмечаемых прибором как клетки. Использование анти-CD66b антител к частицам более 0.5 мкм позволяет отделить клеточный дебрис от живых клеток, что, в свою очередь, в последнем случае дает сниженную чистоту популяции [9]. Однако фагоцитирующая активность клеток в данном исследовании, независимо от положительной или негативной селекции, не отличается между данными группами.

Сравнение двух методов негативной сортировки позволило выявить ряд закономерностей. Негативная селекция моноцитов по методу MACS показывает более высокий относительный размер клеток, но меньшую зернистость. По сравнению с ними моноциты, выделенные по методике EasySep, содержат большое число гранул в цитоплазме [11]. Усиление созревания после стимула менее выражено при использовании EasySep, чем при использовании MACS, по сравнению с нестимулированными моноклеарными клетками. Таким образом, низкая степень грануляции и больший размер клеток свидетельствуют о большей выраженности фагоцитирующей активности созревающих моноклеаров.

Моноциты, выделенные с помощью EasySep, производят меньше дендритных клеток, что отражено в высокой гибели клеток во время дифференцировки в моноцитарные дендритные клетки. Поскольку последние имеют изначально более дифференцированный статус и содержат большое число гранул, можно сказать, что данные изменения могут способствовать активации механизмов апоптоза. Кроме того, значительную цитотоксичность Т-клетки проявляют преимущественно при стимуляции MACS-изолированными моноцитами, что указывает на снижение антиген-презентирующих свойств у клеток, выделенных при использовании метода EasySep.

Моноциты, выделенные методом магнитной сепарации, дифференцируются в дендритные клетки со значительно более высокой пролиферативной способностью и большим количеством клеток, экспрессирующих двойной позитивный CD14⁺/CD11b⁺ (наличие мембранных белков CD11c и CD14) фенотип, без влияния на их жизнеспособность в сравнении с клетками, изолированными адгезией к пластику [10]. Примечательно, что наблюдается снижение CD14⁺ клеток в популяции, изолированных по методу адгезии. Однако в данной работе не проводилось положительной селекции, что не позволяет судить о влиянии CD14⁺/CD11b⁺ клеток на дифференциацию и фенотип моноцитов.

Разделение клеток на двойном градиенте позволяет выделять до $150 \pm 40 \times 10^6$ моноцитов, которые могут быть дифференцированы в $70 \pm 30 \times 10^6$ макрофагов на каждую дозу лейкоцитарной пленки. Средний выход макрофагов из 20 независимых образцов составляет $47 \pm 14\%$ от общего количества выделенных моноцитов [18]. Высокие результаты дифференциации наблюдали при рекордно низком содержании макрофагального колониестимулирующего фактора роста (M-CSF). Данный цитокин необходим для пролиферации, дифференциации и выживания моноцитов, поскольку снижает активность проапоптотических факторов [26].

Таким образом, выбор метода изоляции моноцитов зависит от конкретных целей исследования. Получение большого числа жизнеспособных клеток высокой чистоты для дальнейших экспериментов, таких как анализ экспрессии генов или создание культуры клеток, возможно при применении FACS метода. Он также демонстрирует лучшие результаты при изоляции малочисленных популяций клеток [27]. В то же время для быстрого получения большого количества клеток можно применить MACS или разделение на градиентах плотности.

В зависимости от применяемого метода существенно варьируют свойства клеток (табл.). Наибольшая чистота и жизнеспособность наблюдается при применении MACS и FACS, а также при разделении на двух последовательных градиентах. Метод адгезии также способен давать необходимую чистоту при заметно сниженном выходе и длительном инкубировании (3 ч - 16 ч) [19], что, однако, часто оказывается существенно затруднено из-за загрязнения лимфоцитами [8].

Различий по чистоте моноцитарной фракции в выделенной популяции в градиенте плотности фиколла или перколла между собой не отмечается, однако ее чистота снижена в сравнении с методами MACS и FACS.

Однако методы магнитной и флуоресцентной сортировки представляют наибольшую сложность в пробоподготовке и оценке результатов. Кроме того, для проведения анализа необходимы дорогостоящие реактивы и оборудование, недоступное для большинства клинических лабораторий. Метод адгезии наиболее прост в применении, но получение чистой

популяции моноцитов может быть затруднено. Метод разделения на градиенте плотности позволяет получать клетки с высокой чистотой и жизнеспособностью и не требует длительной подготовки.

Заключение

Таким образом, для клинической практики наиболее применимыми методами изоляции моноцитов можно назвать разделение методом центрифугирования в градиенте фиколла и перколла, в том числе с использованием коммерческих наборов (SepMate и Cell Preparation Tube). Адгезия мало применима из-за высокого загрязнения популяции моноцитов лимфоцитами. Для исследовательских целей возможно применение как FACS, так и MACS. Поскольку MACS демонстрирует более высокую процессивность и возможность выделения нескольких образцов параллельно, то он наиболее применим в рутинных операциях. FACS наиболее удобен для увеличения выхода малочисленных популяций клеток, а также как наиболее детализированный метод для итогового оценивания эффективности любого из вышеприведенных методов.

Список литературы

1. Huang M.N., Nicholson L.T., Batich K.A., Swartz A.M., Kopin D., Wellford S., Prabhakar V.K., Woroniecka K., Nair S.K., Fecci P.E., Sampson J.H., Gunn M.D. Antigen-loaded monocyte administration induces potent therapeutic antitumor T cell responses // J. Clin. Invest. 2020. Vol. 130. Is. 2. P. 774-788. DOI: 10.1172/JCI128267.
2. Белобородов В.А., Воробьев В.А., Семинский И.Ж., Калягин А.Н. Порядок выполнения систематического обзора и мета-анализа по протоколу PRISMA // Система менеджмента качества: опыт и перспективы. Иркутский государственный медицинский университет. 2023. Вып. 12. С. 5-9.
3. Pan J., Wan J. Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain // Journal of Immunological Methods. 2020. Vol. 486. P. 112834. DOI: 10.1016/j.jim.2020.112834.
4. Beliakova-Bethell N., Massanella M., White C., Lada S., Du P., Vaida F., Blanco J., Spina C.A., Woelk C.H. The effect of cell subset isolation method on gene expression in leukocytes // Cytometry A. 2014. Vol. 85. Is.1. P. 94-104. DOI: 10.1002/cyto.a.22352.
5. Weiss R., Gerdes W., Leonhardt F., Berthold R., Sack U., Grahner A. A comparative study of two separation methods to isolate monocytes // Cytometry A. 2019. Vol. 95. Is.2. P. 234-241. DOI: 10.1002/cyto.a.23633.

6. Delirez N., Shojaeefar E., Parvin P., Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells // *Cell J.* 2013. Vol. 15. Is. 3. P. 218-223.
7. 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.
8. Nielsen M.C., Andersen M.N., Moller H.J. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages *in vitro* // *Immunology.* 2020. Vol. 159. Is. 1. P. 63-74. DOI: 10.1111/imm.13125.
9. Zhou L., Somasundaram R., Nederhof R.F., Dijkstra G., Faber K.N., Peppelenbosch M.P., Fuhler G.M. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies // *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. Vol. 19. Is. 7. P. 1065-1074. DOI: 10.1128/CVI.05715-1.
10. Figueroa G., Parira T., Laverde A., Casteleiro G., El-Mabhouh A., Nair M., Agudelo M. Characterization of Human Monocyte-derived Dendritic Cells by Imaging Flow Cytometry: A Comparison between Two Monocyte Isolation Protocols // *J. Vis. Exp.* 2016. Vol. 116. P. 54296. DOI: 10.3791/54296.
11. Marques G.S., Silva Z., Videira P.A. Antitumor Efficacy of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells: Comparing Effects of two Monocyte Isolation Methods // *Biol. Proced. Online.* 2018. Vol. 20. Is. 4. DOI: 10.1186/s12575-018-0069-6.
12. Грачев А.Н., Карагодин В.П., Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Рудимов Е.Н., Орехова Е.А., Хренов М.О., Авхачева Н.В., Мубаракшина Е.К., Кжышковска Ю.Г., Орехов А.Н. Выделение моноцитов из крови человека для изучения влияния факторов внешней среды на иммунитет // *Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический.* 2009. Т.114. Вып. 3. С. 291-296.
13. 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. Is. 5. P. 410-415. DOI: 10.1089/bio.2015.0104.
14. Lehner M., Holter W. Endotoxin-free purification of monocytes for dendritic cell generation via discontinuous density gradient centrifugation based on diluted Ficoll-Paque Plus // *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002. Vol. 128. Is. 1. P. 73-76. DOI: 10.1159/000058006.
15. Bae J., Son C.-H., Park Y.-S., Kim D.-W., Kim S.-H., Kang C.-D. Isolation of Monocytes with High Purity and Yield from Peripheral Blood Mononuclear Cells by Flotation Density Gradient Centrifugation // *Journal of Life Science.* Is. 200919. P. 728-734. DOI: 10.5352/JLS.2009.19.6.728.

16. Chometon T.Q., Siqueira M.D.S., Sant Anna J.C., Almeida M.R., Gandini M., Martins de Almeida Nogueira A.C., Antas P.R.Z. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells // PLoS One. 2020. Vol. 15. Is. 4. P. e0231132. DOI: 10.1371/journal.pone.0231132.
17. 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.
18. Menck K., Behme D., Pantke M., Reiling N., Binder C., Pukrop T., Klemm F. Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags // J. Vis. Exp. 2014. Vol. 91. P. e51554. DOI: 10.3791/51554.
19. Meskini M., Amanzadeh A., Salehi F., Bouzari S., Karimipoor M., Fuso A., Fateh A., Siadat S.D. A protocol to isolate and characterize pure monocytes and generate monocyte-derived dendritic cells through FBS-Coated flasks // Sci. Rep. 2024. Vol. 14. Is.1. P. 23956. DOI: 10.1038/s41598-024-75376-3.
20. Bhattacharjee J., Das B., Mishra A., Sahay P., Upadhyay P. Monocytes isolated by positive and negative magnetic sorting techniques show different molecular characteristics and immunophenotypic behaviour // F1000Res. 2017. Vol. 23. Is. 6. P. 2045. DOI: 10.12688/f1000research.12802.3.
21. Cui C., Schoenfelt K.Q., Becker K.M., Becker L. Isolation of polymorphonuclear neutrophils and monocytes from a single sample of human peripheral blood // STAR Protoc. 2021. Vol. 2. Is. 4. P. 100845. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100845.
22. Connelly A.N., Huijbregts R.P.H., Pal H.C., Kuznetsova V., Davis M.D., Ong K.L., Fay C.X., Greene M.E., Overton E.T., Hel Z. Optimization of methods for the accurate characterization of whole blood neutrophils // Sci. Rep. 2022. Vol. 12. Is. 1. P. 3667. DOI: 10.1038/s41598-022-07455.
23. Golke T., Mucher P., Schmidt P., Radakovics A., Repl M., Hofer P., Perkmann T., Fondi M., Schmetterer K.G., Haslacher H. Delays during PBMC isolation have a moderate effect on yield, but severely compromise cell viability // Clin. Chem. Lab. Med. 2022. Vol. 60. Is. 5. P. 701-706. DOI: 10.1515/cclm-2022-0003.
24. Stefansson S., Adams D. L., Tang C.-M. Isolation of Low Abundance Proteins and Cells Using Buoyant Glass Microbubble Chromatography // Chromatography Research International. 2013. P. 341036. DOI: 10.1155/2013/341036.
25. Liou Y.R., Wang Y.H., Lee C.Y., Li P.C. Buoyancy-activated cell sorting using targeted biotinylated albumin microbubbles // PLoS One. 2015. Vol. 10. Is. 5. P. e0125036. DOI: 10.1371/journal.pone.0125036.
26. Zhang Y., Morgan M.J., Chen K., Choksi S., Liu Z.G. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation // Blood. 2012. Vol. 119. Is. 12. P. 2895-2905.

DOI: 10.1182/blood-2011-08-372383.

27. Smolinska A., Chodkowska M., Kominek A., Janiec J., Piwocka K., Sulejczak D., Sarnowska A. Stemness properties of SSEA-4+ subpopulation isolated from heterogenous Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells // Front. Cell Dev. Biol. 2024. Vol. 12. P. 1227034.

DOI: 10.3389/fcell.2024.1227034.