

ПОЛУЧЕНИЕ МИЕЛОИДНЫХ СУПРЕССОРНЫХ КЛЕТОК ИЗ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ *IN VITRO*

Тимганова В.П., Шардина К.Ю., Бочкова М.С., Усанина Д.И.,
Заморина С.А.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»
г. Пермь, Россия

Резюме. Миелоидные супрессорные клетки (MDSC), как ключевые регуляторы иммунных реакций, представляют интерес с точки зрения разработки и усовершенствования клеточных технологий в биомедицине. Усиление супрессивной активности этих клеток актуально для разработки терапии аутоиммунных заболеваний и невынашивания беременности, а ее подавление может быть полезно при лечении рака, поскольку известно, что MDSC подавляют противоопухолевый иммунитет.

Однако существует проблема, препятствующая активному изучению MDSC, заключающаяся в сложном получении достаточного их количества. Выделение MDSC у онкологических больных сопряжено со сложностями этического характера. Кроме того, такие MDSC могут отличаться по субпопуляционному составу и супрессивной активности в силу индивидуальных факторов. С подобными проблемами могут сталкиваться и исследователи, генерирующие MDSC человека из клеток костного мозга. Поэтому поиск надежного и доступного источника этих клеток для облегчения исследования их функций крайне актуален.

Попытки получить MDSC человека *in vitro* предпринимаются уже давно. В качестве факторов, индуцирующих дифференцировку MDSC вне организма человека, описаны GM-CSF, IL-6, IL-1 β , IL-4, PGE2, LPS, M-CSF, IFN γ . Однако, несмотря на множество использованных факторов, не все схемы однозначно воспроизводимы и приводят к генерации достаточного количества клеток целевой популяции. Ранее нами была разработана и схема дифференцировки MDSC из CD11b⁺ клеток периферической крови человека, которая позволила получить осязательный, но все же недостаточный для исследований функциональной активности процент клеток.

Для того, чтобы повысить количество MDSC в культурах, мы разработали схему дифференцировки этих клеток из моноцитов периферической крови (CD14⁺ клеток), предварительно трансформированных в РСМО (программируемые клетки моноцитарного происхождения). Моноциты, выделенные методом иммуномагнитной сепарации культивировали неделю в дедифференцирующей среде

Адрес для переписки:

Тимганова Валерия Павловна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
E-mail: timganovavp@gmail.com

Address for correspondence:

Valeria P. Timganova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-77-94.
E-mail: timganovavp@gmail.com

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, К.Ю. Шардина, М.С. Бочкова,
Д.И. Усанина, С.А. Заморина «Получение миелоидных
супрессорных клеток из моноцитов периферической
крови *in vitro*» // Российский иммунологический
журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 449-456.
doi: 10.46235/1028-7221-13987-IVP

© Тимганова В.П. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.P. Timganova, K.Yu. Shardina, M.S. Bochkova,
D.I. Usanina, S.A. Zamorina "In vitro production of myeloid
suppressor cells from peripheral blood monocytes", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 449-456.
doi: 10.46235/1028-7221-13987-IVP

© Timganova V.P. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13987-IVP

(полная питательная среда с добавлением М-CSF, IL-3 и β -меркаптоэтанола), затем среду заменяли, добавляя GM-CSF, культивировали три дня, и затем добавляли LPS и IL-1 β для индукции супрессивной активности.

Обнаружено, что культивирование CD14⁺ клеток по двухнедельной схеме с предварительным созданием дедифференцирующих условий приводило к незначительному снижению процента живых клеток в культуре. Однако наблюдалась тенденция к увеличению процента MDSC в культуре (с 34 до 40% в среднем) и к усилению их супрессивной активности (экспрессии аргиназы и ИДО). Процент Arg⁺ клеток увеличивался, в среднем, на 10%, а ИДО⁺ клеток – на 16%. Помимо этого, процент зрелых М-MDSC был достоверно в несколько раз выше, чем при использовании схемы дифференцировки из CD11b⁺ клеток.

Таким образом, данный метод получения MDSC позволяет увеличить количество клеток, относящихся к условно «зрелой» моноцитарной субпопуляции MDSC, а также процент функциональных супрессивных клеток в ней. Описанная схема может применяться для повышения качества исследований, направленных на модулирование функций MDSC с целью разработки новых терапевтических подходов.

Ключевые слова: миелоидные супрессорные клетки, дифференцировка MDSC *in vitro*, иммуносупрессия, дедифференцировка моноцитов, CD14⁺ клетки

IN VITRO PRODUCTION OF MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Timganova V.P., Shardina K.Yu., Bochkova M.S., Usanina D.I.,
Zamorina S.A.

Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are of interest as key regulators of the immune response for the development and improvement of cellular technologies in biomedicine. Enhancing the suppressive activity of these cells is important for developing therapies for autoimmune diseases and miscarriages, and their suppression may be useful in the treatment of cancer, since MDSCs are known to suppress antitumor immunity. However, there is a problem that prevents the active study of MDSCs, i.e., the difficulty in obtaining sufficient numbers of this cell population. Isolation of MDSCs in cancer patients poses an ethical challenge. Moreover, these MDSC may differ in subpopulation composition and suppressive activity due to individual factors. Researchers who generate human MDSC from bone marrow cells may also face similar problems. Therefore, finding a reliable and affordable source of these cells to facilitate the study of their functions is extremely important. Attempts to obtain human MDSCs *in vitro* have been ongoing for a long time. GM-CSF, IL-6, IL-1 β , IL-4, PGE2, LPS, M-CSF, IFN γ are described as factors that induce the *ex vivo* MDSC differentiation. However, despite multiple factors used, not all protocols are clearly reproducible, leading to generation of a sufficient number of cells in the target population. Previously, we had also developed a scheme for MDSC differentiation from CD11b⁺ cells derived from human peripheral blood, which made it possible to obtain a tangible but still insufficient percentage of cells to study functional activity.

To increase the number of MDSCs in cultures, we developed a protocol aimed for differentiation of these cells from peripheral blood monocytes (CD14⁺ cells) previously transformed into PCMO (programmed cells of monocytic origin). The monocytes isolated by immunomagnetic separation were cultured in a de-differentiating medium (complete culture medium supplemented with M-CSF, IL-3 and β -mercaptoethanol) for one week. Later on, the medium was replaced by the addition of GM-CSF, being cultured for three days, followed by addition of LPS and IL-1 β in order to induce suppressive activity. We have found that culturing CD14⁺ cells on a two-week schedule with prior creation of dedifferentiation conditions resulted in a slightly decreased percentage of viable cells in culture. However, there was a trend towards an increased ratio of MDSCs in culture (from an average of 34 to 40%) and an increase in their suppressive activity (arginase and IDO expression). The percentage of Arg⁺ cells increased by average of 10%, and IDO⁺ cells, by 16%. Moreover, the percentage of

mature M-MDSCs was significantly (several-fold) higher when compared with differentiation protocol using CD11b⁺ cells. Hence, this method of MDSCs production enables us to increase the number of cells belonging to the conditionally “mature” monocyte subpopulation of MDSCs, as well as the percentage of functional suppressor cells in the population. The described scheme may be used to improve the quality of studies aimed at modulating MDSC functions in order to develop new therapeutic approaches.

Keywords: myeloid-derived suppressor cells, MDSC differentiation in vitro, immunosuppression, monocyte dedifferentiation, CD14⁺ cells

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-25-00378).

Введение

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC) – немногочисленная популяция клеток миелоидного происхождения, включающая в себя подобные нейтрофилам (PMN-MDSC) и моноцитам (M-MDSC) клетки, способные подавлять иммунный ответ, в том числе и противоопухолевый. Количество MDSC в периферической крови увеличивается при таких патологиях, как рак, хроническое воспаление, сепсис, аутоиммунные заболевания, и в норме – во время беременности [1]. Кроме того, происходит накопление миелоидных супрессоров непосредственно в микроокружении опухоли, в местах аутоиммунного воспаления, в плаценте [3].

Механизм иммуносупрессивного действия MDSC опосредован поверхностными молекулами CD73, ADAM17, PD-L1, Gal-9 и CD40, цитокинами IL-10, TGF- β и активными формами кислорода. Помимо этого, MDSC способны истощать в среде аминокислоты аргинин и триптофан, используя для этого ферменты индуцибельную NO-синтазу и аргиназу 1 (Arg 1).

Являясь одними из самых мощных иммуносупрессивных клеток, MDSC способствуют прогрессированию опухоли, ингибируя противоопухолевые функции T- и NK-клеток. Помимо этого, MDSC напрямую стимулируют развитие опухоли, способствуя неоваскуляризации и инвазии опухолевых клеток, создают предметастатическую среду [3] и играют большую роль в возникновении резистентности опухоли к противораковой терапии [5].

Безусловно, нельзя говорить об однозначно негативном значении миелоидных супрессоров для организма. Их важная биологическая роль заключается в обеспечении иммунной толерантности матери к плоду [6]. Кроме того, MDSC принимают участие в поддержании гомеостаза, ангиогенезе и заживлении ран [10].

Однако знания о месте MDSC в аутоиммунитете находятся в стадии накопления. В ряде исследований описаны полезные функции этих клеток при аутоиммунных заболеваниях, подтверждаю-

щие возможность использования MDSC в терапии соответствующих патологий [2].

Что касается роли миелоидных супрессоров в трансплантационном иммунитете, ряд научных коллективов на моделях животных показали, что MDSC способствуют выживанию аллотрансплантатов при пересадке кожи, роговицы и сердца [15]. Помимо этого, есть данные о том, что процент реципиентов с 1- и 5-летней выживаемостью трансплантатов был выше в группе с высоким уровнем MDSC. По этой причине интерес к данным клеткам в качестве агентов клеточной терапии, способных улучшать приживаемость аллогенных трансплантатов, постоянно растет.

Важно подчеркнуть, что разработка терапевтических подходов, основанных на манипулировании MDSC, требует их выделения и/или пролиферации *in vitro*.

В основном получение миелоидных супрессоров человека с целью их исследования основано на выделении из крови онкологических больных либо на генерации из стволовых клеток. Однако сбор стволовых клеток костного мозга, как и забор крови у больных раком, сопряжен с этическими проблемами, поиском пациентов/доноров и получением добровольного информированного согласия.

На сегодняшний день имеются работы, описывающие более доступную *in vitro* индукцию MDSC из клеток периферической крови. В качестве факторов, индуцирующих дифференцировку MDSC вне организма человека, описаны GM-CSF, IL-6, IL-1 β , IL-4, PGE2, LPS, M-CSF, IFN γ . Однако, несмотря на кажущееся разнообразие существующих вариантов, не все схемы однозначно воспроизводимы и приводят к генерации достаточного количества клеток целевой популяции.

Нами была разработана схема дифференцировки MDSC из CD11b⁺ клеток периферической крови человека [11], которая позволила получить осязательный, но все же недостаточный для исследований функциональной активности процент клеток.

Поиск способов увеличения пула MDSC натолкнул нас на исследования, касающиеся дедифференцировки моноцитов и получения

программируемых клеток моноцитарного происхождения [13].

Моноциты периферической крови по сути являются клетками-предшественниками, которые при соответствующей стимуляции мигрируют к местам воспаления и проникают в ткани, приобретая характеристики активированных макрофагов. В качестве альтернативы они способны созревать в несколько классов резидентных тканевых макрофагов [4]. Описано несколько популяций культивируемых клеток человека, происходящих из циркулирующих моноцитов и обладающих способностью дифференцироваться в макрофаги [8]. Ungefrogen H. и соавт. разработали протокол для получения из моноцитов человека «программируемых клеток моноцитарного происхождения» (ПКМО, РСМО), обладающих повышенной пластичностью. Во время 6-дневной дедифференцировки (обработки макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF) и интерлейкином-3 (IL-3)) клетки подавляли экспрессию ряда маркеров, связанных с иммунными функциями моноцитов, таких как CD14, TLR-2, TLR-4, TLR-7, TLR-9, а также цитозольной субъединицы NADPH оксидазы p47phox. Кроме того, РСМО эндогенно экспрессировали различные маркеры эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и были способны индуцироваться при наличии соответствующих сигналов в клетки, напоминающие эндотелиоциты, хондроциты и остеобласты.

Эти результаты показали, что в среде, содержащей соответствующие факторы роста, моноциты периферической крови могут быть, по крайней мере частично, перепрограммированы без экзогенного введения факторов плюрипотентности.

Таким образом, **целью нашего исследования** была дифференцировка MDSC из моноцитов периферической крови человека *in vitro* с целью получения достаточного количества клеток целевой популяции.

Материалы и методы

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и Протоколом к Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. На используемую экспериментальную схему получено одобрение Комитета по этике ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 15 февраля 2022 г., протокол № 15. У всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

Объект исследования. Образцы венозной крови были взяты у здоровых доноров (небеременные женщины, $n = 4$, возраст 25-39 лет) путем венопункции с помощью вакуумных пробирок BD Vacutainer™, Greiner-bio-one, Австрия). Мо-

нонуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности ($\rho = 1,077$ г/см³, «Диаколл», «Диаэм», Россия).

Дифференцировка CD14⁺ клеток. CD14⁺ клетки выделяли из МПК с помощью позитивной иммуномагнитной сепарации (MacsiBeads, колонки MS, (Miltenyi Biotec, Германия)). Выделенные CD14⁺ клетки культивировали в 96-луночных планшетах (1×10^6 клеток/мл, 200 мкл) в полной питательной среде (среда RPMI 1640 (Sartorius) с добавлением 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин (оба из ICN Pharmaceuticals, США), пенициллин-стрептомицин-амфотерицин В (BI, Израиль)) и 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Corning, США) во влажной атмосфере в CO₂ – инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 14 дней с 3-кратной заменой среды. Чтобы поляризовать CD14⁺ в клетки MDSC, на первом этапе мы культивировали клетки в течение 6 дней в среде для дедифференцировки, состоящей из среды RPMI 1640 с 50 мкмоль/мл β-меркаптоэтанола (для удаления активных форм кислорода), 5 нг/мл M-CSF и 0,4 нг/мл человеческого IL-3. На 4-й день среду заменяли на свежую [13]. На 7-й день проводили замену среды на среду RPMI 1640 с добавлением 20 нг/мл GM-CSF. На 10-й день вновь осуществляли смену среды на среду RPMI 1640 с добавлением 20 нг/мл IL-1β и 0,1 мкг/мл LPS [11].

На 14-й день культивирования осуществляли снятие культур и окрашивание клеток. Жизнеспособность клеток после 14-дневной инкубации оценивали с помощью окрашивания устойчивым к фиксации красителем Zombie Aqua (ZA) (Invitrogen, США). Подготовку образцов для окрашивания поверхностных клеточных молекул проводили в соответствии с инструкциями производителя антител (R&D, США).

Использовали следующую панель антител для поверхностного окрашивания: анти-HLA-DR-Alexa Fluor 750, анти-CD33-APC, анти-CD11b-Alexa Fluor 405, анти-CD66b-PE, анти-CD14-PerCP (R&D Systems, США). Для исключения лимфоцитов и NK-клеток из целевого гейта использовали антитела: анти-CD19-AF700, анти-CD56-AF700, анти-CD3-AF700. Пробоподготовку для внутриклеточного окрашивания проводили при помощи реагентов BioLegend (США). Для детекции внутриклеточных аргиназы-1 (Arg 1) и индоламин 2,3-диоксигеназы (ИДО) использовали антитела и изотипические контроли Anti-human/mouse Arginase 1-Alexa Fluor 488 и Rat IgG 2a Kappa isotype control – Alexa Fluor 488, Invitrogen; Anti human IDO (AF488) и mouse IgG1 control (AF488), R&D Systems (Biotechne, США). Пробы FMO (fluorescence

minus one) и изотипические контроли использовали для разделения «негативных» и «позитивных» популяций. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Определяли процент общей популяции MDSC (Lin⁻HLA-DR⁺CD11b⁺CD33⁺) от живых клеток, а также процент M-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁺CD11b⁺CD33⁺CD14⁺CD66b⁻) и PMN-MDSC (Lin⁻HLA-DR⁺CD11b⁺CD33⁺CD66b⁺CD14⁺) от всех MDSC. После гейтирования ZA-Lin⁻CD11b⁺CD33⁺ клеток на отдельных гистограммах определяли процент Arg⁺ и IDO⁺ клеток.

Данные проточной цитометрии обрабатывали с помощью программы CytExpert (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prizm 8.0.1 с использованием критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы, нижнего квартиля и верхнего квартиля – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Уровень значимости был принят за 0,05.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что дифференцировка MDSC из CD14⁺ клеток сопровождалась статистически значимым, но незначительным снижением жизнеспособности клеток в культуре. Зафиксировано снижение процента живых клеток по сравнению с предыдущей схемой дифференцировки MDSC с 98,32 (97,88-98,71) в культуре CD11b⁺ клеток до 97,28 (96,15-97,86) в культуре (p = 0,024).

В среднем относительное количество клеток, которые можно отнести к общей популяции MDSC, в новой схеме дифференцировки из CD14⁺ клеток было выше, чем в эксперименте с CD11b⁺ клетками. Максимальный процент HLA-DR⁺Lin⁻CD11b⁺CD33⁺ клеток достигал 67, в то время как в предыдущей схеме – только 43. Тем не менее статистически значимых отличий по этому показателю между двумя схемами выявлено не было (табл. 1).

Процент клеток, содержащих Arg 1 и ИДО также имел тенденцию к повышению в куль-

турах, содержащих CD14⁺ клетки в качестве предшественников MDSC. Однако процент PMN-MDSC, который и в предыдущей схеме был крайне невысоким, в новой модели имел тенденцию к снижению (табл. 1).

Процент «зрелых» M-MDSC, т. е. HLA-DR⁺CD33⁺CD11b⁺ клеток, несущих на поверхности молекулу CD14, в схеме дифференцировки супрессоров из моноцитов периферической крови был в среднем выше в 3 раза, чем в модели получения MDSC из CD11b⁺ клеток (рис. 1). Важно отметить, что, процент M-MDSC был сопоставим с количеством клеток, содержащих Arg 1 и ИДО, что является подтверждением их функциональной состоятельности.

Как мы уже упоминали, получение функционально активных MDSC *in vitro* имеет большую практическую значимость для разработки клеточных технологий, использующих иммунорегуляторную способность этих клеток для терапии аутоиммунных патологий и посттрансплантационных осложнений.

С момента первых работ, описывающих миелоидные супрессоры, прошло более сорока лет. С начала двухтысячных годов ведутся исследования по получению MDSC в лабораторных условиях. Помимо дифференцировки супрессоров из стволовых клеток описаны методы их генерации из клеток крови *in vitro* с добавлением различных цитокинов и ростовых факторов, а также при сокультивировании с опухолевыми линиями клеток [9].

Ранее нашим коллективом были опробованы методы генерации MDSC из разных типов клеток периферической крови. В качестве клеток-предшественников мы использовали мононуклеары периферической крови, изолированные CD33⁺ и CD11b⁺ клетки. В качестве молекул индукции – GM-CSF, IL-1β, IL-6, LPS, IFNγ. Время инкубации варьировало от одной недели до трех недель [11].

ТАБЛИЦА 1. ПРОЦЕНТ MDSC, PMN-MDSC И MDSC, СОДЕРЖАЩИХ Arg1 И ИДО В КУЛЬТУРАХ CD11b⁺ И CD14⁺ КЛЕТОК, ИНДУЦИРОВАННЫХ В МИЕЛОИДНЫЕ СУПРЕССОРЫ; n = 4, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. PERCENTAGE OF MDSC, PMN-MDSC AND MDSC CONTAINING Arg1 AND IDO IN CULTURES OF CD11b⁺ AND CD14⁺ CELLS INDUCED INTO MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS; n = 4, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Источник Source	MDSC %	PMN-MDSC %	Arg1 ⁺ Arg 1 ⁺ %	ИДО ⁺ IDO ⁺ %
CD11b ⁺ клетки CD11b ⁺ cells	34,21 (11,79-43,29)	2,155 (0,26-7,87)	39,49 (33,80-45,33)	43,59 (34,53-57,55)
CD14 ⁺ клетки CD11b ⁺ cells	39,75 (22,21-66,75)	0,815 (0,475-1,935)	50,5 (45,36-56,43)	60,54 (47,76-69,97)

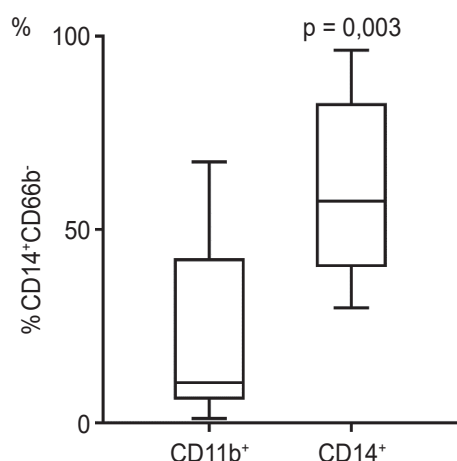


Рисунок 1. Процент М-MDSC от общей популяции MDSC, полученных из CD14⁺ клеток

Примечание. n = 4; по оси абсцисс – вид клеток, из которых дифференцировали MDSC; по оси ординат – процент М-MDSC в гейте общей популяции миелоидных супрессоров. Показаны медианы (горизонтальные линии), межквартильные размахи (прямоугольники), максимальные и минимальные значения («усы»). Указано значение $p < 0,05$ по отношению к культурам CD11b⁺ клеток.

Figure 1. Percentage of M-MDSCs from the total population of MDSCs derived from CD14⁺ cells

Note. n = 4; x axis, the type of cells from which MDSC was differentiated; y-axis, percentage of M-MDSC in the gate of the total population of myeloid suppressors. Medians (horizontal lines), interquartile ranges (rectangles), maximum and minimum values ("whiskers") are shown. The $p < 0.05$ value is indicated in relation to CD11b⁺ cell cultures.

В целом по увеличению процента выхода целевой популяции клеток в наших экспериментальных культурах можно выстроить клетка-предшественники MDSC следующим образом: мононуклеары периферической крови – CD33⁺ клетки – CD11b⁺ клетки – CD14⁺ клетки. Однако

нужно понимать, что однозначный вывод можно сделать только устранив вариации во времени культивирования, в добавляемых молекулах-индукторах и их концентрациях. Но все же можно выделить общую для всех использованных нами схем тенденцию. Во всех культурах клеток количество М-MDSC превышало количество PMN-MDSC, причем иногда в более чем в десять раз. Можно предположить, что для дифференцировки PMN-MDSC в наших экспериментальных условиях необходимо наличие менее зрелого костномозгового миелоидного предшественника. Интересно, что у больных раком людей и у животных с опухолями PMN-MDSC способны дифференцироваться из М-MDSC, за что ответственно эпигенетическое подавление транскрипции гена ретинобластомы Rb1 [14].

Отличия М-MDSC от PMN-MDSC, которые можно назвать преимуществами для биомедицинских исследований, касающихся индукции толерантности к трансплантату, в том, что они не требуют прямого контакта с Т-клетками для подавления их иммунного ответа, а их супрессивное действие является неспецифическим. Кроме того, есть данные, что М-MDSC в пересчете на одну клетку эффективнее PMN-MDSC. Еще одной важной особенностью М-MDSC является их способность поддерживать размножение регуляторных Т-клеток *in vitro* [7].

Заключение

Таким образом, нами разработана эффективная методика получения достаточного количества функционально активных М-MDSC из моноцитов периферической крови в количестве, позволяющем проводить дальнейшие исследования по манипулированию функциями этих клеток.

Список литературы / References

1. Шардина К.Ю., Заморина С.А., Раев М.Б., Черешнев В.А. Роль миелоидных супрессорных клеток в процессах формирования иммунной толерантности в период беременности // Цитология, 2022. Т. 64, № 2. С. 116-125. Shardina K.Yu., Zamorina S.A., Rayev M.B., Chereshev V.A. The role of myeloid suppressor cells in the processes of formation of immune tolerance during pregnancy. *Tsitologiya = Cytology*, 2022, Vol. 64, no. 2, pp. 116-125. (In Russ.)
2. Crook K.R., Liu P. Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease. *World J. Immunol.*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 26-33.
3. Fainaru O., Hantisteanu S., Hallak M. Immature myeloid cells accumulate in mouse placenta and promote angiogenesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2011, Vol. 204, no. 6, pp. 544.e18-544.e23.
4. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 12, pp. 953-964.
5. Ibanez-Vea M., Zuazo M., Gato M., Arasanz H., Fernandez-Hinojal G., Escors D., Kochan G. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: current knowledge and future perspectives. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2018, Vol. 66, pp. 113-123.

6. Köstlin N., Kugel H., Spring B., Leiber A., Marmé A., Henes M., Rieber N., Hartl D., Poets C.F., Gille C. Granulocytic myeloid derived suppressor cells expand in human pregnancy and modulate T-cell responses. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 9, pp. 2582-2591.
7. Kumar V., Patel S., Tcyganov E., Gabrilovich D.I. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 3, pp. 208-220.
8. Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Izumi K., Yasuoka H., Ogawa Y., Kawakami Y., Ikeda Y. Human circulating CD14⁺ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 74, no. 5, pp. 833-845.
9. Lechner M.G., Megiel C., Russell S.M., Bingham B., Arger N., Woo T., Epstein A.L. Functional characterization of human Cd33⁺ and Cd11b⁺ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, 90. doi: 10.1186/1479-5876-9-90.
10. Sanchez-Pino M.D., Dean M.J., Ochoa A.C. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): When good intentions go awry. *Cell Immunol.*, 2021, Vol. 362, 104302. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104302.
11. Shardina K., Timganova V., Bochkova M., Uzhviyuk S.. Generation of human myeloid-derived suppressor cells from CD11b⁺ Cells *in vitro*. In: Isaeva, E., Rocha, Á. (eds) Science and Global Challenges of the 21st Century – Innovations and Technologies in Interdisciplinary Applications. Perm Forum 2022. Lecture Notes in Networks and Systems, 2023, Vol 622. Springer, Cham.
12. Umansky V., Blattner C., Gebhardt C., Utikal J. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. *Vaccines*, 2016, Vol. 4, no. 4, 36. doi: 10.3390/vaccines4040036.
13. Ungefroren H., Fändrich F. The programmable cell of monocytic origin (PCMO): a potential adult stem/progenitor cell source for the generation of islet cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, Vol. 654, pp. 667-682.
14. Youn J.I., Kumar V., Collazo M., Nefedova Yu., Condamine T., Cheng P., Villagra A., Antonia S., McCaffrey J.C., Fishman M., Sarnaik A., Horna P., Sotomayor E., Gabrilovich D.I. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, pp. 211-220.
15. Zhang W., Li J., Qi G., Tu G., Yang C., Xu M. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation: the dawn of cell therapy. *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, 19. doi: 10.1186/s12967-018-1395-9.

Авторы:

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Шардина К.Ю. — инженер-исследователь лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shardina K. Yu., Research Assistant, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Усанина Д.И. — инженер лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Usanina D.I., Research Assistant, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 10.07.2023
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023
Accepted 12.07.2023