

УДК 576.08:616-092.18

ENDOBOOST PLUS — СРЕДА ВЫБОРА ДЛЯ НАРАЩИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МАССЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИХ КЛЕТОК

© 2025 г. В. Г. Матвеева^{1, *}, Д. К. Шишкова¹, Е. А. Торгунакова¹, А. Г. Кутихин¹

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, 650002, Россия

* E-mail: matveeva_vg@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2024

После доработки 21.11.2024

Принята к публикации 27.11.2024

Эндотелиальные колониформирующие клетки (Endothelial colony-forming cells, ECFC) обладают мощным клонотическим и репаративным потенциалом, что делает их перспективным материалом для клеточной терапии, экспериментальной биологии и медицины. Возможность быстрого увеличения клеточной массы — ключевой момент использования ECFC в этих направлениях. Нами разрабатывается состав питательной среды для эндотелиальных клеток EndoBoost и EndoBoost Plus. «Золотым стандартом» в культивировании ECFC признана среда Endothelial Cell Growth Medium2 (ECGM2). Цель нашего исследования — сравнительная оценка эффективности питательных сред EGM2, EndoBoost и EndoBoost Plus для наращивания культуры ECFC. Максимальная пролиферативная активность ECFC зарегистрирована в среде EndoBoost Plus, менее активной признана EndoBoost и самый низкий результат соответствовал EGM2. Таким образом, предпочтительной средой для наращивания клеточной массы ECFC, выделенных из периферической крови взрослого человека, является EndoBoost Plus.

Ключевые слова: эндотелиальные колониформирующие клетки, питательные среды, пролиферация

Принятые сокращения: КИ — клеточный индекс; МАК — миелоидные ангиогенные клетки; МНФ — мононуклеарная фракция; ЭК — эндотелиальные клетки; ECFC — эндотелиальные колониформирующие клетки (endothelial colony-forming cells); EGM2 — среда для выращивания эндотелиальных клеток 2 (endothelial cell growth medium 2); PBS — фосфатно-солевой буферный раствор; VE-кадгерин — кадгерин сосуда эндотелия; VEGF — факторы роста эндотелия сосудов; VWF — фактор фон Виллебранда.

DOI: 10.31857/S0041377125010026, EDN: DFELCO

Эндотелиальные колониобразующие клетки (endothelial colony-forming cells, ECFC) представляют собой тип эндотелиальных клеток (ЭК), обладающих мощным клонотическим и ангиогенным потенциалом, способностью восстанавливать поврежденный эндотелий в сосудах и формировать кровеносные сосуды *de novo* (постнатальный васкулогенез) (Medina et al., 2017). Васкулогенное свойство ECFC дополнительно усиливается высвобождением паракринных факторов, являющихся трофическими медиаторами (Pearson, 2010). Возможность выделения колоний ECFC из периферической крови в сочетании с благоприятными свойствами делает их рациональным источником ЭК для регенеративной медицины, тканевой инженерии и экспериментальной биологии.

Перспектива использования ECFC в клеточной терапии связана с их прямым участием в восстановлении сосудов в норме и при ряде заболеваний. В на-

стоящее время эффективность клеточной терапии ECFC активно изучается на доклиническом этапе и, чаще всего, включает воздействие на ишемизированные органы и ткани (Liao et al., 2020; Lyons, O'Brien, 2020). В большинстве случаев получены обнадеживающие результаты, но выраженная гетерогенность признаков при выделении популяции эндотелиальных предшественников для клеточной терапии требует структурирования подходов прежде, чем будут начаты клинические исследования. Ввиду неоднозначности трактовки понятия эндотелиальных предшественников в 2017 г. научным сообществом определена и рекомендована к использованию номенклатура, разделяющая клетки, выделенные в культуре из крови, на миелоидные ангиогенные клетки (МАК) и ECFC (Medina et al., 2017).

МАК относятся к гемопоэтической линии, они не являются ни эндотелиальными, ни прогенитор-

ными клетками, их проангиогенный и вазорепаративный потенциал опосредован паракринным механизмом. ECFC, напротив, имеют эндотелиальное происхождение, способны к прямому участию в восстановлении поврежденного эндотелия и формированию кровеносных сосудов *de novo*. Использование четких критериев чистоты и идентичности используемых клеток — крайне важное требование для любого продукта клеточной терапии. ECFC в культуре идентифицируют по соответствию, характерному эндотелиальному фенотипу, включающему фактор фон Виллебранда VWF (CD31⁺CD146⁺CD144⁺CD105⁺VWF⁺), отсутствию гемопоэтических маркеров (CD45⁺CD14⁺), наличию клоногенной и пролиферативной активности, способности формировать капиллярноподобные структуры *in vitro* и (или) *in vivo*.

Эффективным и физиологическим способом решения проблемы ранних тромбозов сердечно-сосудистых имплантов является создание на поверхности тромборезистентного эндотелиального монослоя. ECFC — наиболее подходящий клеточный материал для реализации этого подхода, поскольку они могут быть получены неинвазивно из собственной крови пациента и после наращивания клеточной массы заселены на поверхности протезов. В сравнении со зрелым сосудистым эндотелием ECFC экспрессируют маркеры всех трех направлений эндотелиальной дифференцировки (венозной, артериальной и лимфатической), занимая промежуточное положение в иерархии ЭК и обладая некой универсальностью (Kutikhin et al., 2020). Соответственно, в зависимости от места имплантации протеза, аутологичные ECFC способны дифференцироваться в соответствующий вид ЭК при отсутствии иммунологической реакции организма и возможности переноса инфекций (Banno, Yoder, 2018), что открывает перспективу широкого их применения для преэндотелизации биоинженерных сердечно-сосудистых имплантатов и их персонализации.

Другое крупное направление использования ECFC связано с экспериментальной биологией и медициной. ECFC являются максимально адаптированной экспериментальной моделью для изучения особенностей клеточных реакций, влияния различных факторов и патологических состояний на сосудистый эндотелий (Lyons, O'Brien, 2020).

ECFC в периферической крови представляют собой редкую популяцию (Barclay et al., 2012; Tura et al., 2013), при этом пролиферативный потенциал выделенных колоний может значительно

различаться в зависимости как от доноров, так и от источника (Prasain et al., 2012). Облегчение адгезии и увеличение (поддержание) скорости пролиферации ECFC становится определяющим моментом для реализации перспектив прикладных и фундаментальных исследований.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) — сигнальный белок, который играет ключевую роль в ангиогенезе, регулируя пролиферацию, миграцию и выживание ЭК (Cai et al., 2006; Wang et al., 2008). Другие пептидные факторы роста, такие как фактор роста фибробластов (FGF), ангиопоэтин, трансформирующие факторы роста (TGF), TNF- α , апелин и инсулиноподобные факторы роста (IGF) также влияют на пролиферацию и функциональные свойства эндотелия. Однако большинство этих факторов дополняют или координируют сигнализацию VEGF, то есть действуют как опосредованные регуляторы ангиогенеза и функций ЭК (Cox et al., 2006). Известно, что VEGF стимулирует пролиферацию ЭК дозозависимым образом (Dragoni et al., 2011), при этом нет линейной зависимости концентрации VEGF и пролиферативной активности клеток (Cai et al. 2006).

Классической средой для выделения и культивирования ECFC является Endothelial cell growth medium2 (EGM2). В нашем Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ) разрабатывается состав эндотелиальных питательных сред EndoBoost и EndoBoost Plus, которые поддерживают нормальный и, соответственно, ускоренный пролиферативный потенциал эндотелиальных клеток. Важным отличием сред является различное содержание VEGF: EndoBoost Plus содержит увеличенное содержание VEGF в сравнении со средой EndoBoost. Для оценки эффективности и формирования рекомендаций по использованию сред для наращивания ECFC требуется сравнение стандартного подхода с использованием полной питательной среды EGM2 и разработанных нами EndoBoost и EndoBoost Plus.

Поэтому цель нашей работы заключалась в оценке и сравнении влияния различных сред на пролиферативную активность ECFC, выделенных из крови взрослого человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и культивирование ECFC. Все культуральные работы проводили в стерильных условиях. Первичные колониеформирующие эндотелиаль-

ные клетки человека (ECFCs) выделяли из крови донора в возрасте 55 лет. В пробирки с гепарином забирали венозную кровь в объеме 40 мл. Мононуклеарную фракцию (МНФ) выделяли на градиенте плотности Ficoll-Paque premium (17-5442-02; GE Healthcare, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные из интерфазы клетки дважды промывали в 10 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS) pH 7.4 (#70011036; Thermo Fisher Scientific, США) с последующим центрифугированием при 250 g в течение 7 мин при 23 °C. МНФ ресуспендировали в полной питательной среде EGM-2 (Endothelial cell growth medium2 BulletKit®, #CC-3162; Lonza, Швейцария), содержащей комплекс ростовых факторов, биологически активных веществ и 5% фетальной бычьей сыворотки (FBS), входящих в набор. Суспензию клеток высевали на культуральные флаконы 25 см², покрытые фибронектином (10 мкг/мл) плазмы быка (1.4.11; «Биолот», Россия). Культивирование проводили в условиях CO₂-инкубатора при 37 °C и 5% CO₂. Питательную среду меняли на следующий день после посева для удаления неадгезированных клеток и дебриса, в последующем смену среды проводили 1 раз в двое суток.

На седьмые сутки начали формироваться колонии в виде «булыжной мостовой»; в это время клетки снимали, делили на две равные части. Одну часть ресуспендировали в полной питательной среде EGM2, другую — в EndoBoost Plus, высевали во флаконы 75 см², предварительно покрытые бычьим коллагеном I типа (Corning™ Collagen I, Bovine) 50 мкг/мл (11533550; Thermo Fisher Scientific, США). Контроль роста культур проводили ежедневно методом фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия). При достижении 70–80% конфлюентности культуры пассировали на три флакона 75 см² и продолжали культивирование в соответствующих питательных средах. На этапе пассажей определяли число клеток во флаконе с помощью счетчика Luna II (Logos biosystems, Корея) и фенотипирование клеток методом проточной цитометрии. Для открепления клеток от подложки использовали смесь трипсин/ЭДТА 0.25% (Gibco 0.5% Trypsin-EDTA) (#15400-054; Thermo Scientific, США).

Определение фенотипа клеток. 1. *Проточная цитометрия.* В пробирки отбирали 100 мкл среды, содержащей 1×10^5 клеток, снятых с пластика и отмытых PBS с 0.1% азида натрия (S2002; Sigma-Aldrich, США). В работе использовали комбина-

ции моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) к CD90 (PN IM1839U; Beckman Coulter, США) и к CD14 (PN IM0645U; Beckman Coulter, США); с Alexa Fluor 700 (AF700) к CD31 (303134; Biolegend, США); с фикоэритрином (PE) к CD133 (372804; Biolegend, США); с аллофикоцианином (APC) к CD34 (PN IM1870U; Beckman Coulter, США); с фикоэритрин—цианином 7 (PC7) к CD146 (361008; Biolegend, США) и CD105 (323218; Biolegend, США); с Krome Orange (KrOr) к CD45 (A96416; Beckman Coulter, США); с Pacific Blue (PB) к CD45 (304029; Biolegend, США).

Пробоподготовку культур клеток проводили согласно протоколам фирм-производителей по двум панелям: 1) CD90, CD133, CD146, CD34, CD31, CD45 и 2) CD14, CD45, CD105. В пробу вносили от 2 до 20 мкл соответствующих антител с дальнейшей инкубацией 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Контролем служили образцы с равным основной пробе содержанием изотипических антител; пробоподготовку изотипического контроля выполняли аналогично основной пробе. Окрашенные пробы анализировали на проточном лазерном цитометре CytoFlex (США) в программе CytExpert 2.4. Настройку прибора для каждой панели выполняли с использованием изотипического контроля, дальнейший анализ всех образцов проводили на единых настройках прибора. Для исключения дуплетов клеток и дебриса выделяли целевой гейт по FSC-A (forward scatter area) и FSC-H (forward scatter height) с переносом на гистограмму FSC/SSC (forward scatter/side scatter) для последующих этапов анализа. Оценивали долю позитивных клеток (%) в гейте для каждого целевого маркера.

2. *Конфокальная микроскопия.* Клетки 4–5-го пассажей рассеивали в 4-луночные культуральные камеры (80841; Ibidi GmbH, Германия), предварительно покрытые бычьим коллагеном I типа в концентрации 50 мкг/мл (354231; Thermo Fisher Scientific, США), выращивали до монослоя и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание на CD31, CD144, VWF, виментин, коллаген IV, фибронектин, F-актин, α -актин. Для этого образцы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 10 мин. Перед окрашиванием внутриклеточных маркеров (VWF, α -актина и F-актина) проводили пермеабиллизацию 0.01%-ным раствором Triton X-100. Неспецифическое связывание блокировали раство-

ром 1 %-ного бычьего сывороточного альбумина на PBS. Клетки инкубировали при 4 °C в течение ночи с первичными антителами: кроличьими анти-CD144 в разведении 1:400 (ab33168; Abcam, Великобритания), мышинными анти-CD31 1:20 (ab119339; Abcam, Великобритания), кроличьими антивimentин 1:100 (ab7752; Abcam, Великобритания), кроличьими анти-фибрoneктин 1:100 (ab2413; Abcam, Великобритания), мышинными анти- α -актин 1:1000 (ab7817; Abcam, Великобритания), кроличьими антиколлаген IV 1:100 (ab6586; Abcam, Великобритания); далее трехкратно отмывали от не связавшихся антител PBS. После этого вносили вторичные антитела в разведении 1:500: анти-мышинные осли IgG Highly Cross-Adsorbed-AF555 (A-31572; Invitrogen, США), анти-кроличьи осли IgG Highly Cross-Adsorbed-AF488 (A-21202; Invitrogen, США), анти-кроличьи осли IgG-AF488 (ab150073; Abcam, Великобритания), а также анти-VWF овцы 1:100, конъюгированные с FITC (ab8822; Abcam, Великобритания) и Alexa Fluor 568 Phalloidin 1:40 (A12380; Invitrogen, США) и инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре. Ядра клеток окрашивали DAPI 10 мг/мл (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorid) (D9542; Sigma-Aldrich, США). Окрашенные образцы заключали в ProLong (P36930; Life Technologies, США) и монтировали под покровное стекло. Препараты анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка ангиогенной активности клеток *in vitro*.

Лунки 24-луночного планшета (N-702002, Nest, Китай) покрывали 300 мкл Standard Star Matrigel (0827045, ABW (Mogengel Bio), Китай) и оставляли на 30 мин при комнатной температуре для полимеризации в стерильных условиях. С целью создания стандартных условий для культивирования ECFC была выбрана среда EGM2, рекомендованная большинством международных протоколов. В каждую лунку с Matrigel вносили по 1×10^5 клеток, ресуспендированных в полной питательной среде EGM2. Образование капилляроподобных структур наблюдали через 16 и 20 ч методом фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка пролиферативной активности на различных средах. Предварительную скорость пролиферации клеток оценивали подсчетом посаженных и снятых с флаконов клеток с помощью счетчика Luna II (Logos biosystems, Корея).

Точную количественную характеристику пролиферативной активности получали на анализаторе в режиме реального времени (RTCA) (Real-Time Cell Analysis) xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, США). Предварительно, в целях адаптации и стабилизации скорости пролиферации, ECFC четвертого пассажа культивировали в EGM2 до достижения 80 % конфлюентности, рассеивали на три флакона и культивировали еще 14 сут в различных полных питательных средах EGM2, EndoBoost и EndoBoost Plus. Далее клетки из флаконов переносили отдельно в микролунки E-Plate 16 (ACEA Biosciences, США) по 4000 клеток на 1 лунку в 3—4-м повторе на каждой среде. Конечный объем всех микролунок составлял 200 мкл. Мониторинг роста клеток в режиме реального времени проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C и 5 % CO₂. Импеданс регистрировали в три этапа: каждые 15 с в течение первых 30 мин после внесения клеток; далее каждые 15 мин в течение часа; далее каждые 30 мин в течение 72 ч. Лунки с культуральной средой без добавления клеток использовали как базовое значение сопротивления культуральной среды. После этого на анализаторе RTCA xCELLigence оценивали жизнеспособность и пролиферативную активность клеток по изменению клеточного индекса (КИ) и угол наклона (ч⁻¹). Показатели получали автоматически с помощью программы прибора. Данные представлены в виде средних значений и их стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Статистическая обработка. Использовали пакет прикладных программ GraphPad Prism 8 (<https://www.freesoftwarefiles.com>). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова—Смирнова. Показатели имеют распределение отличного от нормального и представлены в виде медианы и квартилей (Me (25 %; 75 %)). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотип полученной культуры исследовали в соответствии с международными рекомендациями (Medina et al., 2017) на втором и каждом последующем пассаже. Значимых отличий экспрессии целевых маркеров в зависимости от пассажа не отмечали. Все клетки экспрессировали эндотелиаль-

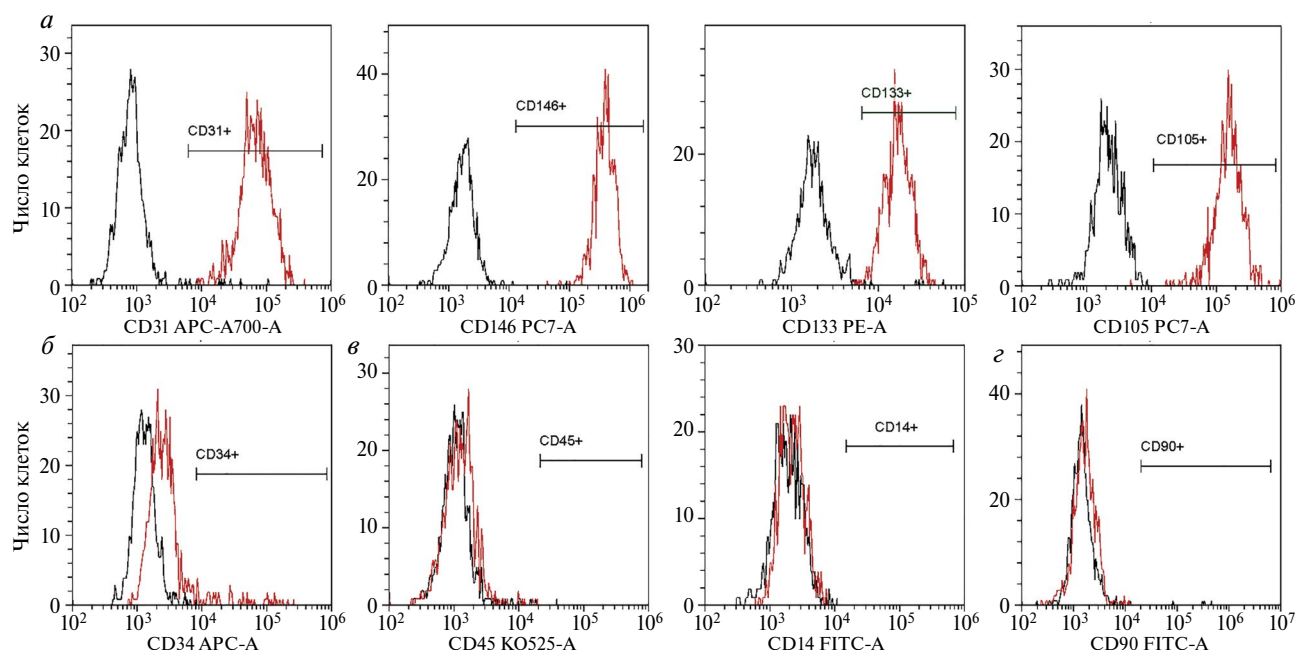


Рис. 1. Типичные гистограммы флуоресценции антигенов на мембране клеток, полученные с помощью проточной цитометрии (флуоресцентно-меченные антитела — красные кривые; изотипический контроль — черные кривые): а — эндотелиальные антигены CD31, CD146, CD133, CD105; б — CD34; в — гемопоэтический линейный маркер CD45 и CD14; г — миелоидный CD90.

ные антигены (рис. 1а: CD31+, CD146+, CD133+, CD105+), часть популяции (8–22%) несла маркер CD34 (рис. 1б). Культура не содержала гемопоэтических маркеров CD45 и CD14 (рис. 1в), также CD90 (рис. 1г).

В процессе деления клетки формировали округлые колонии типичной морфологии «булыжной мостовой» (рис. 2а), которые сливались и образовывали монослой. Анализ флуоресцентной окраски разросшейся культуры подтвердил, что клетки экспрессировали на мембране CD31, в зоне межклеточных контактов определялся CD144 (маркер сосудистого эндотелия VE-кадгерин). Внутри клеток визуализировались тельца Вейбеля–Паладе (яркое, четко очерченное зеленое свечение), на поверхности — диффузные и сетчатые скопления волокон фибронектина и коллагена IV типа, что доказывает их способность синтезировать фактор VWF и белки внеклеточного матрикса (рис. 2б). В клетках не обнаружили мышечноспецифичный α -актин и белок промежуточных филаментов соединительной ткани виментин (см. рис. 2б).

Функциональный тест на Matrigel показал, что через 18 ч после заселения на Matrigel клетки формировали полноценные капилляроподобные структуры, что подтверждает их ангиогенный потенциал (рис. 2в).

Таким образом, совокупность морфологических, фенотипических и функциональных признаков доказывает соответствие культуры критериям, характерным для ECFC.

Пролиферативная активности ECFC на разных средах. Скорость пролиферации клеток оценивали двумя способами: с помощью 1) счетчика и 2) клеточного анализатора в режиме реального времени (xCELLigence).

1. Раздельное культивирование клеток в течение 53 сут на полных питательных средах EGM2 и EndoBoost Plus показало, что скорости их пролиферации различны. Динамику роста колоний с 7 по 17-е сутки до первого пассажа можно проследить на рис. 3а. Для визуального отслеживания выбраны колонии с примерно одинаковым стартовым числом клеток на 7-е сут. На 17-е сут культивирования в среде EndoBoost Plus из этой колонии сформировалась крупная колония с большой плотностью клеток, входящая в 80 %-ный конфлюэнтный слой (после чего выполняли пассаж), тогда как на среде EGM2 количество клеток в колонии лишь незначительно увеличивалось. На рис. 3б отражена зависимость изменения числа клеток при каждом пересеве. При соблюдении равных условий культивирования в течение 53 сут на EGM2 выполнено два пассажа ECFC,

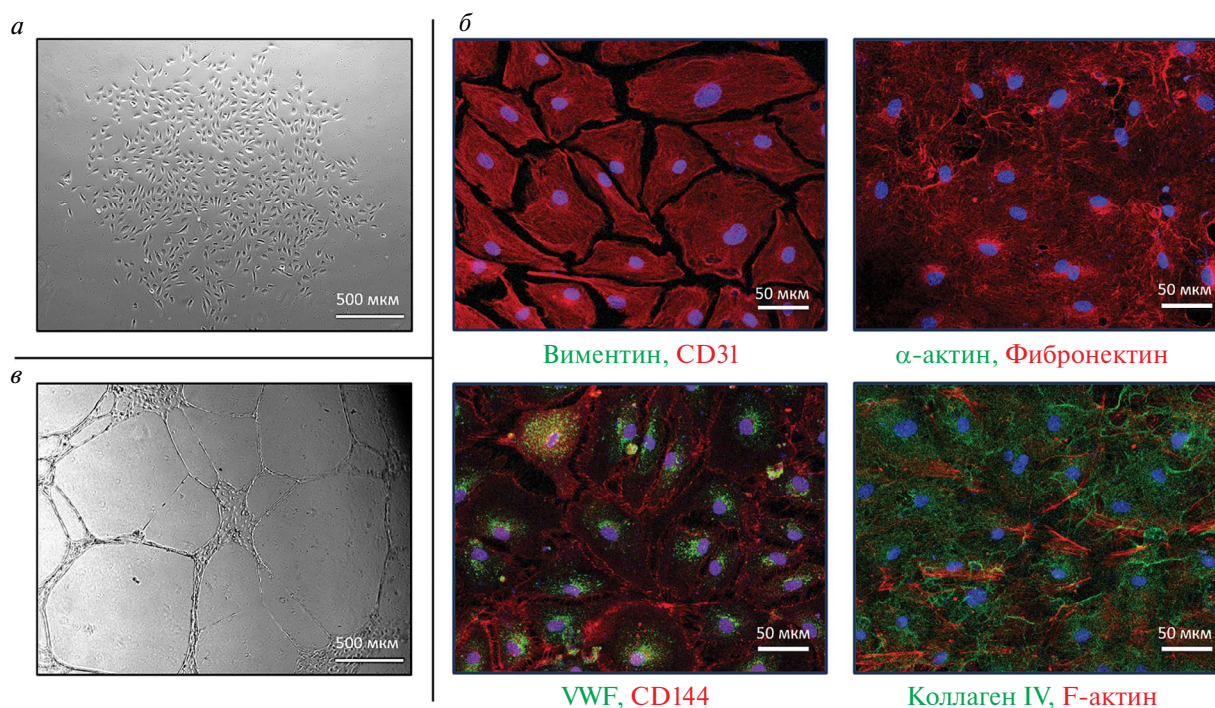


Рис. 2. Типичная морфология колоний ECFC (а), а также флуоресценция поверхностных (CD31, CD144) и внутриклеточных (VWF, F-актин) маркеров и синтезированных клетками белков внеклеточного матрикса (фибронектина, коллагена IV типа) с помощью флуоресцентно-меченных антител. Виментин и α-актин не определяются (б); в — формирование капилляроподобных структур клетками ECFC на Matrigengel; а, в — фазово-контрастная микроскопия, шкала — 500 мкм; б — конфокальная микроскопия, шкала — 50 мкм.

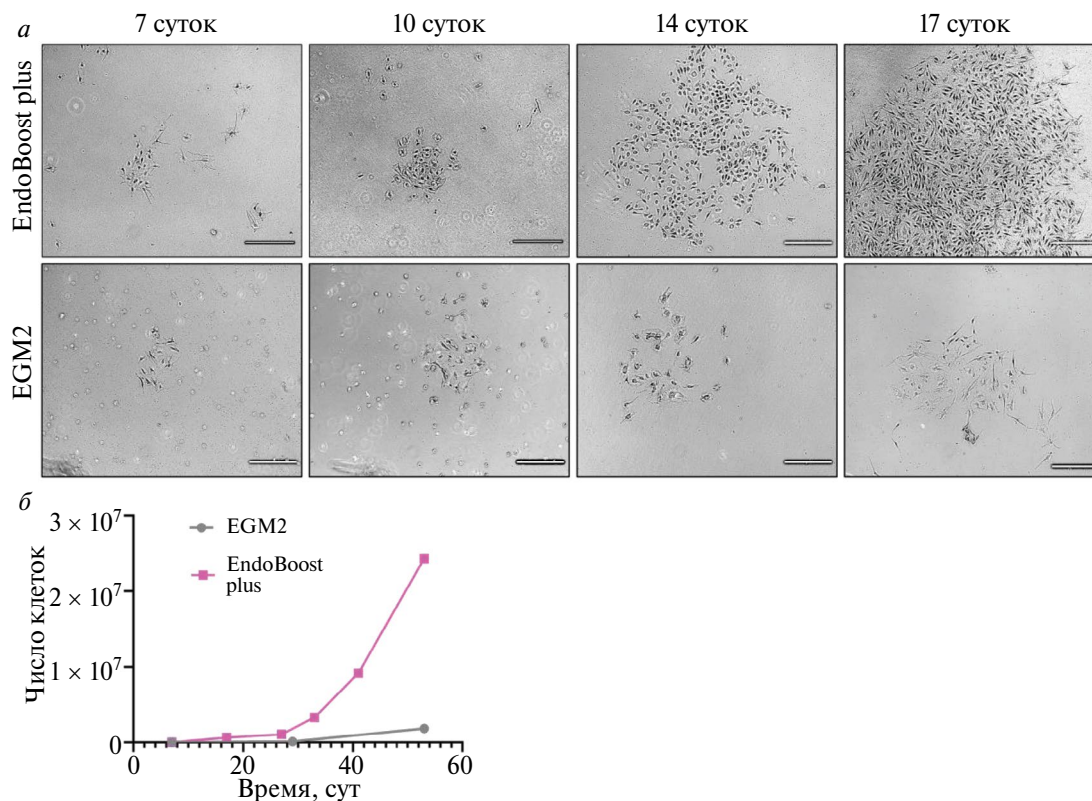


Рис. 3. Сравнение роста колоний ECFC на среде EGM2 и EndoBoost Plus: а — фотографии динамики роста одних и тех же колоний на различных средах в течение 17 сут; б — кривые увеличения числа клеток в культуре ECFC в течение 53 сут (подсчет клеток при проведении пассажей).

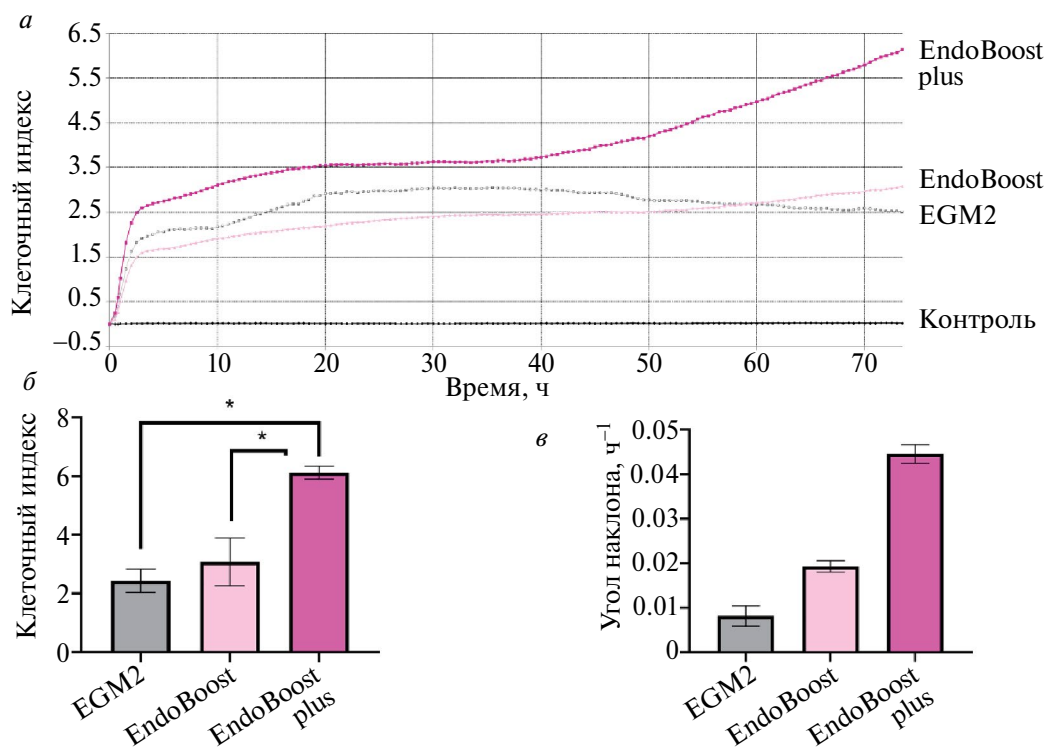


Рис. 4. Рост культуры клеток в режиме реального времени в течение 72 ч на EGM2, EndoBoost и EndoBoost Plus (xCELLigence): *a* — кривая зависимости клеточного индекса (КИ) от времени; *б* — КИ; *в* — угол наклона кривой на различных средах через 72 ч культивирования.

на EndoBoost Plus — пять пассажей. Через 29 сут культивирования в среде EGM2 общее число клеток составляло 100 000, на 53-и сут — 1 840 000. В среде EndoBoost Plus через 17 сут сняли и рассеяли 634 000 клеток, число которых увеличилось до 1 050 000 к 27-м сут и далее до 9 160 000 на 33-и сут и 24 345 000 на 53-и сут.

2. Для более точной оценки скорости пролиферации клеток использовали прибор xCELLigence. После предварительного культивирования ECFC на различных средах (EGM2, EndoBoost, EndoBoost Plus) в течение 14 сут, клетки пересевали на лунки планшета в соответствующую среду и наблюдали за ростом популяции на приборе xCELLigence в реальном времени. Кривые роста на рис. 4*a* демонстрируют адаптационное плато в диапазоне культивирования 18–40 ч, после чего видно быстрое увеличение клеточного индекса (КИ) в среде EndoBoost Plus, более пологая кривая на EndoBoost, и некоторое снижение КИ на EGM2.

Гистограмма на рис. 4*б* показывает значения КИ в каждой из сред в конечной точке культивирования (72 ч). Максимальный КИ зарегистрирован для клеток в среде EndoBoost Plus, при этом он

значимо превышал показатели в двух других средах (EGM2 и EndoBoost). Полная питательная среда EGM2 продемонстрировала самые низкие результаты из всех вариантов сред. Аналогичная зависимость отмечается и на гистограмме, показывающей углы наклона кривых роста (рис. 4*в*), в которой максимальные показатели также соответствуют среде EndoBoost Plus, а минимальные — EGM2.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разнообразие биологических сигналов VEGF приводит к сложной регуляции васкулогенеза и ангиогенеза, миграции и пролиферации, выживания и проницаемости клеток (Delcombel et al., 2013). В организме эти процессы сбалансированы и подвержены строгой регуляции, в которой факторам роста отводится ключевая роль. Известен дозозависимый нелинейный эффект VEGF на пролиферативную активность ЭК, однако нет единого мнения в отношении его наиболее эффективной концентрации и динамики роста в диапазоне концентрации 5–50 нг/мл (Cai, 2006; Athanassiades et al., 1998). При этом влияние VEGF

на пролиферацию ЭК может зависеть от многих факторов, в том числе от степени зрелости ЭК, варианта эндотелиальной дифференцировки, активности VEGF, условий культивирования, вида питательной среды, комбинации и концентрации в ней ростовых факторов, а также других биоактивных молекул.

Широкие перспективы использования ECFC в научно-исследовательских, а также прикладных целях, таких как тканевая инженерия и клеточная терапия с возможностью персонификации, создают предпосылки для разработки протоколов, рекомендаций и питательных сред, облегчающих наращивание клеточной массы. В представленной работе мы сравнили рекомендуемую коммерческую среду EGM2 со средой EndoBoost и EndoBoost Plus, которые завершают этапы разработки и тестирования в Институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия).

Первоначально нами была выделена из крови культура клеток, которая формировала колонии типа «булыжной мостовой», соответствовала фенотипу $CD31^{+}144^{+}146^{+}105^{+}34^{-/+}CD45^{-}14^{-}$, синтезировала vWF, коллаген IV, фибронектин, обладала ангиогенным потенциалом, что соответствовало минимальным международным критериям (морфологии, фенотипа, функциональных свойств) идентификации ECFC.

На полученной культуре ECFC пятого пассажа было протестировано влияние различных эндотелиальных сред на пролиферативную активность. В качестве эталона была выбрана среда EGM2, указанная в большинстве протоколов и международных рекомендаций по выделению и культивированию ECFC. В качестве сравнения выступали разрабатываемые среды среды EndoBoost и EndoBoost Plus.

Раздельное наращивание клеточной массы в процессе культивирования ECFC в течение 53 сут на средах EGM2 и EndoBoost Plus непосредственно сразу после выделения клеток из крови продемонстрировало более чем 10-кратное преимущество EndoBoost Plus перед EGM2.

Преимущество сред EndoBoost и EndoBoost Plus подтверждено с помощью клеточного анализатора RTCA xCelligence, которая позволяет в режиме реального времени без использования красителей и других дополнительных меток оценивать пролиферацию клеточных культур. С помощью периодической (установленной оператором) ре-

гистрации электрического сопротивления в лунке многолуночного планшета в течение заданного времени формируется график зависимости КИ от времени. Это наиболее физиологический и точный метод детекции различий пролиферативной активности, в результате которого исследователь получает более релевантные результаты. Установленный нами временной промежуток, равный 74 ч, учитывал интервал, необходимый для адаптации клеток после пересева и включал время стабилизации пролиферативной активности в условиях достатка питательных веществ и имеющихся ростовых факторов. Количество клеток на лунку также рассчитывали с условием возможного пятикратного увеличения популяции ECFC до достижения конfluence и начала контактного торможения деления клеток. Графические данные демонстрируют, что максимальную пролиферативную активность ECFC поддерживает полная питательная среда EndoBoost Plus, далее в порядке убывания следует EndoBoost и эталонная среда EGM2, в которой пролиферация клеток минимальна.

Таким образом, предпочтительной средой для наращивания клеточной массы ECFC, выделенных из крови взрослого человека, является EndoBoost Plus с увеличенным содержанием фактора VEGF.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках фундаментальной темы Института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия) № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонифицированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и ткане-инженерных имплантатов».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол № 4/1 ЛЭК от 18.04.2022) (Кемерово, Россия). От донора получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Athanassiades A., Hamilton G. S., Lala P. K.* 1998. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol. Reprod.* V. 59. P. 643. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.3.643>
- Banno K., Yoder M. C.* 2018. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.* V. 83. P. 283. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.231>
- Barclay G. R., Tura O., Samuel K., Hadoke P. W., Mills N. L., Newby D. E., Turner M. L.* 2012. Systematic assessment in an animal model of the angiogenic potential of different human cell sources for therapeutic revascularization. *Stem Cell Res. Ther.* V. 3. P. 23. <https://doi.org/10.1186/scrt114>
- Cai J., Jiang W. G., Ahmed A., Boulton M.* 2006. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvasc. Res.* V. 71. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.10.004>
- Cox C. M., D'Agostino S. L., Miller M. K., Heimark R. L., Krieg P. A.* 2006. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev. Biol.* V. 296. P. 177. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.452>
- Delcombel R., Janssen L., Vassy R., Gammons M., Haddad O., Richard B., Letourneur D., Bates D., Hendricks C., Waltenberger J., Starzec A., Sounni N. E., Noël A., Deroanne C., Lambert C., Colige A.* 2013. New prospects in the roles of the C-terminal domains of VEGF-A and their cooperation for ligand binding, cellular signaling and vessels formation. *Angiogenesis.* V. 16. P. 353. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9320-y>
- Dragoni S., Laforenza U., Bonetti E., Lodola F., Bottino C., Berra-Romani R., Carlo Bongio G., Cinelli M. P., Guerra G., Pedrazzoli P., Rosti V., Tanzi F., Moccia F.* 2011. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca^{2+} concentration. *Stem Cells.* V. 29. P. 1898. <https://doi.org/10.1002/stem.734>
- Kutikhin A. G., Tupikin A. E., Matveeva V. G., Shishkova D. K., Antonova L. V., Kabilov M. R., Velikanova E. A.* 2020. Human peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells are highly similar to mature vascular endothelial cells yet demonstrate a transitional transcriptomic signature. *Cells.* V. 9. P. 876. <https://doi.org/10.3390/cells9040876>
- Liao G., Zheng K., Shorr R., Allan D. S.* 2020. Human endothelial colony-forming cells in regenerative therapy: a systematic review of controlled preclinical animal studies. *Stem Cells Transl. Med.* V. 9. P. 1344. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0141>
- Lyons C. J., O'Brien T.* 2020. The Functionality of Endothelial-Colony-Forming Cells from Patients with Diabetes Mellitus. *Cells.* V. 9. Art. ID: 1731. <https://doi.org/10.3390/cells9071731>
- Medina R. J., Barber C. L., Sabatier F., Dignat-George F., Melero-Martin J. M., Khosrotehrani K., Ohneda O., Randi A. M., Chan J. K. Y., Yamaguchi T., Van Hinsbergh V. W. M., Yoder M. C., Stitt A. W.* 2017. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* V. 6. P. 1316. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0360>
- Pearson J. D.* 2010. Endothelial progenitor cells — an evolving story. *Microvasc. Res.* V. 79. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.12.004>
- Prasain N., Meador J. L., Yoder M. C.* 2012. Phenotypic and functional characterization of endothelial colony forming cells derived from human umbilical cord blood. *J. Vis. Exp.* V. 13. Art. ID: 3872. <https://doi.org/10.3791/3872>
- Tura O., Skinner E. M., Barclay G. R., Samuel K., Gallagher R. C., Brittan M., Hadoke P. W., Newby D. E., Turner M. L., Mills N. L.* 2013. Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow. *Stem Cells.* V. 31. P. 338. <https://doi.org/10.1002/stem.1280>
- Wang S., Li X., Parra M., Verdin E., Bassel-Duby R., Olson E. N.* 2008. Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 105. P. 7738. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802857105>

ENDOBOOST PLUS IS THE MEDIUM OF CHOICE FOR THE CELL MASS EXPANSION OF ECFC ISOLATED FROM ADULT BLOOD

V. G. Matveeva^{a, *}, D. K. Shishkova^a, E. A. Torgunakova^a, A. G. Kutikhin^a

^a*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, 650002, Russia*

^{*}*e-mail: matveeva_vg@mail.ru*

Endothelial colony-forming cells (ECFC) have a powerful clonogenic and reparative potential, which makes them a promising material for cell therapy, experimental biology and medicine. The ability to rapidly expand the cell mass is the key to the use of ECFCs in these areas. We are developing the composition of nutrient medium for EndoBoost and EndoBoost Plus endothelial cells. Endothelial cell growth medium2 (EGM2) is recognised as the 'gold standard' in ECFC cultivation. The aim of our study was to comparatively evaluate the efficacy of EGM2, EndoBoost and EndoBoost Plus nutrient media for ECFC culture growth. Maximum proliferative activity of ECFC was detected in EndoBoost Plus medium, EndoBoost was found to be less active and the lowest result corresponded to EGM2. Thus, EndoBoost Plus is the preferred medium for cell culture of ECFCs isolated from adult peripheral blood.

Keywords: endothelial colony-forming cells, culture medium, cell mass expansion