

УДК 611.018.74.085.23:616.1-005.4-003.93

О.С. Губарь^{1,2*}, А.Е. Родниченко^{2,3}, А.В. Злацкая^{2,3}, Д.А. Зубов^{2,3},
Л.С. Литвинова⁴, В.В. Шуплецова⁴, Р.Г. Васильев^{2,3}

Изоляция и крупномасштабное культивирование эндотелиальных клеток-предшественников из периферической крови

UDC 611.018.74.085.23:616.1-005.4-003.93

O.S. Gubar^{1,2*}, A.E. Rodnichenko^{2,3}, O.V. Zlatska^{2,3},
D.O. Zubov^{2,3}, L.S. Litvinova⁴, V.V. Shupletsova⁴, R.G. Vasyliiev^{2,3}

Isolation and Large Scale Expansion of Human Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood

Ключевые слова: эндотелиальные клетки-предшественники, клеточная культура, ишемические нарушения, восстановление сосудов.

Ключові слова: ендотеліальні клітини-попередники, культура клітин, ішемічні порушення; відновлення судин.

Key words: endothelial progenitor cells, cell culture, ischemic disorders, vascular repair.

Существование циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников (EPC – endothelial progenitor cells) было обнаружено в 1997 г. [2]. Несмотря на двадцатилетние интенсивные исследования, идентификация EPC и определяющих их маркеров остается неопределенной и несколько противоречивой [3]. Эндотелиальные клетки-предшественники часто принимают за тканевые эндотелиальные и проангиогенные гемопоэтические клетки. На основании результатов последних исследований EPC определены как CD31⁺CD34^{+/–}CD146⁺CD309(VEGFR–2)⁺CD45[–]CD133[–]-клетки периферической крови, демонстрирующие клональный пролиферативный потенциал, способность к репликации и формированию сосудов *in vivo* [3, 6].

Уникальные свойства делают EPC ценным объектом для использования в регенеративной медицине, в частности для терапии сердечно-сосудистых заболеваний, особенно ишемических состояний различной этиологии. Введение EPC способствовало успешной неоваскуляризации и регенерации ишемических тканей на животных моделях, например, в мышечной модели ишемии задней конечности и модели ишемии

The existence of the circulating endothelial progenitor cells (EPCs) was discovered in 1997 [2]. Despite twenty years of intensive investigation, EPCs definition and identifying markers have remained unclear and somewhat controversial [3]. EPCs are often mixed up with tissue resident endothelial cells and pro-angiogenic hematopoietic cells. However, recent findings clarified these aspects and now EPCs could be commonly defined as CD31⁺CD34^{+/–}CD146⁺CD309(VEGFR–2)⁺CD45[–]CD133[–] cells from peripheral blood, displaying clonal proliferative potential, replating ability, and *in vivo* vessel forming activity [3, 6].

These unique properties make these cells valuable objects for regenerative medicine, *e. g.* for the therapy of cardiovascular diseases, especially for the treatment of ischemic states of different etiology. EPCs successfully promoted neovascularization and regeneration of ischemic tissues in animal models, *e. g.* murine ischemic hind limb model and rat myocardial ischemia model [1]. EPCs are also widely used in human clinical trials. However, most of clinical trials involve freshly isolated EPC-enriched cell fraction from venous blood (using only one or two surface antigens for identification). This

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна

²Біотехнологічна лабораторія ilaya.regeneration, медична компанія ilaya®, м. Київ, Україна

³Державний інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, м. Київ, Україна

⁴Лабораторія імунології і клітинної біотехнології, Балтійський федеральний університет імені Імануїла Канта, м. Калінінград, Росія

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Biotechnology Laboratory ilaya.regeneration, Medical Company ilaya®, Kyiv, Ukraine

³State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁴Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

*Автор, якому необхідно надіслати кореспонденцію:

вул. Заболотного, 150, м. Київ, Україна 03680;
тел.: (+38 044) 200-03-27
електронна пошта: olga.gubar@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

150, Zabolotnogo str., Kyiv, Ukraine 03680;
tel.:+380 44 200 0327
e-mail: olga.gubar@gmail.com

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

© 2018 O.S. Gubar et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

миокарда крысы [1]. Эндотелиальные клетки-предшественники также широко применяют в клинических испытаниях на людях. При этом в большинстве случаев используют свежeweделенную фракцию клеток из венозной крови, обогащенную EPC (с применением только для идентификации одного или двух поверхностных антигенов). Однако данный подход не обеспечивает высокие результаты [7]. В связи с этим изоляция и масштабное культивирование EPC *in vitro* для получения высококачественной терапевтической дозы остаются актуальными для инновационной клеточной терапии при ишемических расстройствах, восстановлении сосудов и эквивалентной трофической поддержке трехмерных тканевых эквивалентов.

В связи с вышеизложенным целью данной работы были разработана малоинвазивного метода получения EPC и подбор условий их масштабного культивирования *in vitro* для получения терапевтической дозы.

Эксперименты проводили в соответствии с нормами биоэтики и биологической безопасности, подтвержденными разрешением биоэтической комиссии Медицинской компании ilaya®. Все доноры подписали информированное согласие на забор крови.

Культура EPC. Мононуклеарные клетки (MNC – mononuclear cells) выделяли из 20 мл гепаринизированной венозной крови пациента 30-минутным центрифугированием в градиенте плотности «Histopaque®-1077» («Sigma-Aldrich», США) при 400g и 4°C. Полученные MNC дважды промывали в PBS и высевали в два культуральных флакона 75 см² («SPL», Корея), покрытых коллагеном, в селективную коммерческую среду для роста эндотелия M1 «Lonza Clonetics EGM™-2MV BulletKit™» («Lonza», Италия) или в самостоятельно собранную среду M2: MCDB 131 («Gibco», Великобритания); 5% FBS («Sigma-Aldrich»); 2 ед./мл гепарина натрия («Indar», Украина); 1 нг/мл VEGF; 10 нг/мл EGF; 2 нг/мл bFGF; 20 нг/мл IGF; 0,2 мкг/мл гидрокортизона; 1 мкг/мл аскорбат-2-фосфата (все производства «Sigma-Aldrich») в мультигазовом инкубаторе («Binder CB 210», Германия) в атмосфере 5% CO₂, 5% O₂ и насыщающей влажности 97%. Клетки субкультивировали смесью трипсина/ЭДТА (0,1 и 0,02% соответственно) в PBS («Sigma-Aldrich»). Плотность посева составляла 3 × 10³ кл на 1 см². Время удвоения популяции клеток рассчитывали по стандартной формуле

$$PDT = T / 3,31 \lg (X_k / X_0);$$

где T – время культивирования; X_k – количество полученных клеток; X_0 – количество засеянных клеток.

Расчет колониобразующих единиц (КОЕ). Для оценки потенциала клоногенности EPC 20 мл гепа-

ри approach can explain somewhat non-promising results of some of these studies [7]. Therefore the isolation and *in vitro* large scale expansion of EPCs in order to obtain a high-quality therapeutic dose have remained an actual goal for innovative cell therapy in ischemic disorders, vascular repair and 3D tissue living equivalent trophic support.

Thus the aim of this study was the development of the low invasive EPC isolation method together with their large-scale expansion *in vitro* in order to obtain a therapeutic dose.

All the experiments were done in accordance with the bioethics and biological safety norms confirmed by the permission of Medical Company ilaya® Bioethics Committee. All the donors have signed an informed consent before blood donation.

EPC culture. Mononuclear cells (MNCs) were concentrated from 20 ml of heparinized venous blood of a patient by centrifugation in Histopaque®-1077 density gradient (Sigma-Aldrich, USA) at 400g for 30 min at 4°C. The obtained MNCs were washed twice in PBS and seeded either in two collagen-coated T75 cm² culture flasks (SPL, Korea) into the selective commercial endothelium growth medium (M1) Lonza Clonetics EGM™-2MV BulletKit™ (Lonza, Italy) or in self-formulated EPCs medium, M2: MCDB 131 medium (Gibco, UK); 5% FBS (Sigma-Aldrich, USA); 2 U/ml heparin sodium (Indar, Ukraine); 1 ng/ml VEGF; 10 ng/ml EGF; 2 ng/ml bFGF; 20 ng/ml IGF; 0.2 µg/ml hydrocortisone; 1 µg/ml ascorbate-2-phosphate (all manufactured by Sigma-Aldrich, USA) in a multi-gas incubator (Binder CB 210, Germany) in atmosphere of 5% CO₂ and 5% O₂ and a saturating humidity of 97%. Cells were subcultured with a 0.1/0.02% trypsin/EDTA mixture in PBS (Sigma-Aldrich, USA). The seeding density was 3 × 10³ cells per 1 cm². The cell population doubling time (PDT) was calculated according to the following standard formula:

$$PDT = T / 3.31 \lg (X_k / X_0);$$

where T – cell culture time; X_k – number of obtained cells; X_0 – number of plated cells.

Colony forming units (CFUs) calculating. To assess the EPC clonogenic potential, 20 ml heparinized whole blood vs. MNC fraction isolated from 20 ml blood over Histopaque®-1077 density gradient each sample was seeded each per one collagen-coated 175 cm² culture flask (SPL, Korea) in growth medium Lonza Clonetics EGM™-2MV BulletKit™ and cultured for 14 days. The cells were both fixed and stained for CFU calculating.

EPC tube formation assay. The EPCs were added to the Matrigel™ Matrix-coated (Corning, USA) well of 24-well plate (SPL, Korea) at the density of 10³ cells per 200 µL, at a final medium volume of 200 µL per



ринизированной цельной крови либо фракции MNC, выделенных из 20 мл крови в градиенте плотности «Histopaque®-1077», каждый образец высевали в один культуральный флакон 175 см², покрытый коллагеном («SPL») в питательной среде «Lonza Clonetics EGM™-2MV BulletKit™» и культивировали в течение 14 суток. Клетки фиксировали и окрашивали для подсчета КОЕ.

Анализ способности EPC к формированию трубчатых структур. Эндотелиальные клетки-предшественники засеивали в 24-луночный планшет («SPL»), покрытый «Matrigel™ Matrix» («Corning», США) с плотностью 10³ кл в 200 мкл при конечном объеме среды 200 мкл на лунку. Затем их инкубировали при 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ в течение ночи в среде «Lonza Clonetics EGM™-2MV BulletKit™». За это время EPC образовали хорошо сформированные трубчатые сети. Карiotипирование EPC проводили на пассаже P4 методом GTG-banding [9].

Проточная цитометрия. Фенотип клеток оценивали с помощью FACS (fluorescence-activated cell sorting) на проточном цитометре «BD FACSAria» («BD Pharmingen», «BD Horizon», США). Окрашивание моноклональными антителами (PerCP-Cy5.5-конъюгированные мышиные антитела против CD105 человека; APC-конъюгированные мышиные антитела против CD73 человека; FITC-конъюгированные мышиные антитела против CD90 человека; PE-Cy5-конъюгированные мышиные антитела против HLA-DR человека; PE-Cy7-конъюгированные мышиные антитела против CD31 человека; APC-конъюгированные мышиные антитела против CD34 человека; FITC-конъюгированные мышиные антитела против CD45 человека; PE-CF594-конъюгированные мышиные антитела против CD49f человека; BV421-конъюгированные мышиные антитела против CD166 человека; PE-конъюгированные мышиные антитела против CD309 человека) выполняли согласно инструкции производителя («BD Pharmingen», «BD Horizon»).

Выделение EPC и культивирование in vitro. Одной из основных проблем культивирования EPC является их выделение, поскольку доля в общем содержании мононуклеарных клеток периферической крови составляет около 1,7 × 10⁻⁸ [10]. В качестве источника EPC использовали венозную кровь взрослого человека, поскольку данный метод является наименее инвазивным для получения биоматериала. Первоначально мы высевали цельную венозную кровь в культуральные флаконы, покрытые коллагеном (5 мл крови на флакон 75 см²), но этот способ оказался менее эффективным по сравнению с предварительной концентрацией мононуклеарных клеток в градиенте плотности «Histopaque®-1077», что позволило почти полностью удалить эритроциты. Затем мы высевали мононуклеарные клетки из 10 мл крови в флаконы

well. Then they were incubated at 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ overnight in Lonza Clonetics EGM™-2MV BulletKit™ medium. During this time EPCs developed well-formed tube networks. EPCs were karyotyped at P4 using GTG banding technique [9].

Flow cytometry. The cell phenotype was assessed by FACS (fluorescence-activated cell sorting) with the BD FACSAria flow cytometer (BD Pharmingen, BD Horizon, USA). Staining with the monoclonal antibodies (PerCP-Cy5.5 mouse anti-human CD105, APC mouse anti-human CD73, FITC mouse anti-human CD90, PE-Cy5 mouse anti-human HLA-DR, PE-Cy7 mouse anti-human CD31, APC mouse anti-human CD34, FITC mouse anti-human CD45, PE-CF594 mouse anti-human CD49f, BV421 mouse anti-human CD166, PE mouse anti-human CD309) was performed according to the manufacturer's instructions (BD Pharmingen, BD Horizon).

EPCs isolation and in vitro expansion. One of the main difficulties in EPC culture is their isolation as their content among the peripheral blood mononuclear cells is about 1.7 × 10⁻⁸ [10]. We aimed to use the adult venous blood as the source of EPCs as this allowed the less invasive uptake method. Initially we tried seeding the whole venous blood on the collagen-coated cell culture flasks (5 ml of blood per 75 cm² flask), but it appeared less effective compared to prior mononuclear cells concentration using Histopaque®-1077 density gradient, which allowed almost complete erythrocytes elimination. Finally we seeded mononuclear cells from 10 ml of blood per 75 cm² collagen-coated flask in M1 or M2 EPC media. The EPC colonies appeared after 5–10 days in culture (Fig. 1A). Interestingly, there was no correlation between the initial number of mononuclear cells seeded and the resulting number of colonies (data were not shown). Obtained cultures successfully expanded until P4 without significant changes in morphology (Fig. 1B). Unfortunately, most cultures showed growth arrest at P5–P6. Nevertheless, this time of *in vitro* expansion was sufficient to obtain a therapeutic dose of 20–80 × 10⁶ cells. The average PDT value for EPCs cultured in M1 was (35.0 ± 2.0) h vs (44.5 ± 2.8) h in M2 (*p* < 0.05). The number of EPC colonies was 7.1 ± 1.2 (whole blood) vs. (13.3 ± 1.7) (MNC fraction: (52.3 ± 4.9) mln MNCs per 20 ml whole blood per donor) per 175 flask (*p* < 0.02). During all the time of *in vitro* culture the cells were stable and maintained normal karyotype (Fig. 1C).

EPC tube formation. In order to assess functional properties of EPCs after *in vitro* expansion, we performed a tube-forming assay. Consistently with the previous reports [6], all of the obtained EPC cultures readily formed capillary-like structures in the Matrigel™ Matrix (Fig. 1D).

EPC phenotype. The obtained EPCs displayed typical CD31⁺CD34⁺CD146⁺CD309 (VEGFR-2)⁺CD45⁻

75 см², покрытые коллагеном, в средах М1 или М2. Колонии ЕРС появились в культуре через 5–10 суток (рис. 1, А). Интересно, что никакой корреляции между начальным числом засеянных мононуклеарных клеток и полученным количеством колоний установлено не было (данные не приводятся). Полученные культуры успешно культивировались до P4 без значительных морфологических изменений (рис. 1, В). Однако у большинства культур на P5–P6 произошла остановка роста. Тем не менее данного времени было достаточно для получения терапевтической дозы 20–80 × 10⁶ кл. Среднее значение PDT для ЕРС, культивируемых в М1, составило (35,0 ± 2,0) против (44,5 ± 2,8) ч в М2 (*p* < 0,05). Число колоний ЕРС составляло 7,1 ± 1,2 (цельная кровь) против 13,3 ± 1,7 ((52,3 ± 4,9) млн МНС на 20 мл цельной крови на донора) на культуральный флакон 175 см² (*p* < 0,02). В течение всего периода культивирования *in vitro* клетки были стабильными и сохраняли нормальный кариотип (рис. 1, С).

Способность ЕРС к формированию трубчатых структур. Функциональные свойства ЕРС после культивирования *in vitro* оценивали по их способности к формированию трубчатых структур. Согласно ре-

phenotype (assessed by FACS at P4) (Fig.2). They neither expressed another hematopoietic marker HLA-DR. Interestingly, EPCs also expressed two of three typical MSC markers [5]: CD73⁺CD105⁺ but CD90⁻. They also expressed other vessel-related and endothelial

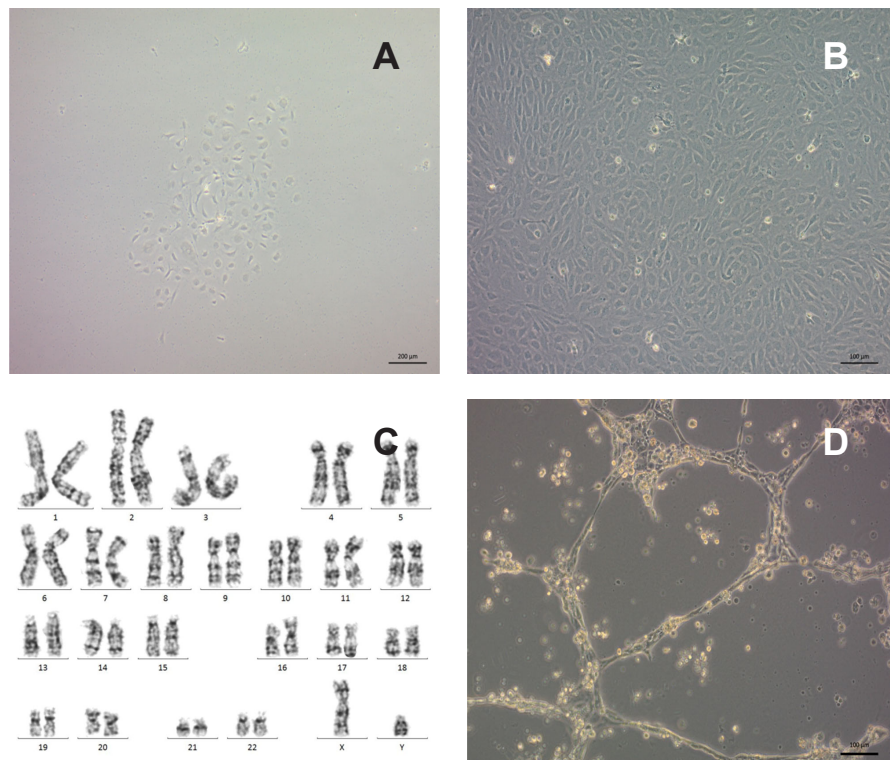


Рис. 1. Морфологическое строение, фенотип и функциональные характеристики ЕРС в культуре: **А** – колония ЕРС в первичной культуре; **В** – морфология клеточного монослоя на P3; **С** – нормальный мужской кариотип на P4 (GTG banding); **Д** – формирование капилляроподобных структур в «Matrigel™ Matrix».

Fig. 1. Cultured EPC morphology, phenotype and functional characteristics. **A** – EPC colony in primary culture; **B** – cell monolayer morphology at P3; **C** – normal male karyotype at P4 (GTG banding); **D** – capillary-like structures formation in Matrigel™ Matrix.

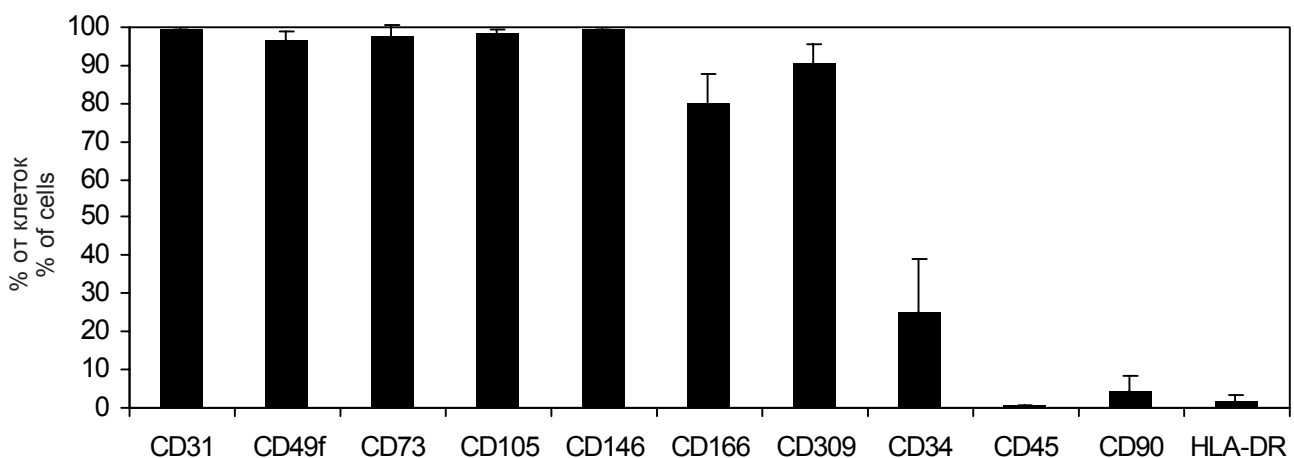


Рис. 2. Иммунофенотип клеток в культуре на P4, FACS, данные представлены как среднее ± стандартное отклонение для пяти популяций.

Fig. 2. Cultured cells immunophenotype at P4, FACS, data presented as mean ±SD for five populations.



зультатам D. Ingram и соавт. [6] все полученные культуры EPC легко формировали капиллярноподобные структуры в «Matrigel™ Matrix» (рис. 1, D).

Фенотип EPC. Полученные EPC демонстрировали типичный CD31⁺CD34⁺/-CD146⁺CD309 (VEGFR-2)⁺CD45⁻-фенотип (FACS на P4), но при этом не экспрессировали гематопозитический маркер HLA-DR (рис. 2). Интересно, что EPC также экспрессировали два из трех типичных маркеров MSC [5]: CD73⁺CD105⁺, но не CD90. Кроме того, EPC экспрессировали другие сосудистые и эндотелиальные маркеры, в частности, интегрин альфа-6 [4] и активированную молекулу адгезии лейкоцитов: CD49f⁺CD166⁺ [8].

В целом наши данные показывают, что EPC можно успешно выделять из венозной крови и культивировать *in vitro* для получения значительных терапевтических доз с сохранением их свойств. Полученные результаты открывают новые возможности применения EPC в регенеративной медицине: стимуляция ангиогенеза при сложных ишемических нарушениях и трофическая поддержка трехмерных эквивалентов.

Литература

1. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. et al. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 2011; 29(11): 1650–1655.
2. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964–966.
3. Basile D., Yoder M. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol* 2014; 229(1): 10–16.
4. Bouvard C., Gafsou B., Dizier B. et al. Alpha-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2010; 30(8): 1569–1575.
5. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006; 8(4): 315–317.
6. Ingram D., Mead L., Tanaka H. et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104(9): 2752–2760.
7. Mitchell A., Fujisawa T., Newby D. et al. Vascular injury and repair: a potential target for cell therapies. *Future Cardiol* 2015; 11(1): 45–60.
8. Ohneda O., Ohneda K., Arai F. et al. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 2001; 98(7): 2134–2142.
9. Schreck R., Distech C. Chromosome Banding Techniques. *Cur Prot Hum Genet* 2001; Chapter 4: Unit 4.2.
10. Yoder M., Mead L., Prater D. et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109(5): 1801–1809.

markers such as integrin alpha-6 [4] and activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) [8]: CD49f⁺CD166⁺.

Altogether our data demonstrated that EPCs could be successfully isolated from venous blood and expanded *in vitro* to therapeutic significant doses without losing their properties. These findings open new possibilities for the EPC application in regenerative medicine both for angiogenesis boosting in complex ischemic disorders and 3D tissue equivalents trophic support.

References

1. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. et al. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 2011; 29(11): 1650–1655.
2. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997; 275(5302): 964–966.
3. Basile D., Yoder M. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol* 2014; 229(1): 10–16.
4. Bouvard C., Gafsou B., Dizier B. et al. Alpha-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 2010; 30(8): 1569–1575.
5. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006; 8(4): 315–317.
6. Ingram D., Mead L., Tanaka H. et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104(9): 2752–2760.
7. Mitchell A., Fujisawa T., Newby D. et al. Vascular injury and repair: a potential target for cell therapies. *Future Cardiol* 2015; 11(1): 45–60.
8. Ohneda O., Ohneda K., Arai F. et al. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 2001; 98(7): 2134–2142.
9. Schreck R., Distech C. Chromosome Banding Techniques. *Cur Prot Hum Genet* 2001; Chapter 4: Unit 4.2.
10. Yoder M., Mead L., Prater D. et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109(5): 1801–1809.