

# ПОЛУЧЕНИЕ КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИХ КЛЕТОК ИЗ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ ПОПУЛЯЦИИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

**Торгунакова Е.А., Матвеева В.Г., Антонова Л.В.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,  
г. Кемерово, Россия*

**Резюме.** Колониеформирующие эндотелиальные клетки (ECFCs, КФЭК) — редкая популяция циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников (EPC), которая представляет интерес для тканевой инженерии, клеточной терапии и изучения патогенеза заболеваний, связанных с нарушением функции эндотелия. Реализация данных направлений подразумевает использование чистых культур эндотелиальных колониеформирующих клеток, которые могут быть получены из мононуклеарной фракции периферической крови человека. Достаточно точным методом оценки фенотипа и чистоты клеточной культуры может являться проточная цитометрия.

Цель данного исследования заключалась в том, чтобы получить популяцию колониеформирующих эндотелиальных клеток, и с помощью метода проточной цитометрии подтвердить фенотип и оценить чистоту популяции.

Для получения КФЭК использовали гепаринизированную донорскую кровь из периферической вены. Выделяли мононуклеарную фракцию на градиенте плотности Histopaque 1077. Полученные клетки культивировали в полной питательной среде EGM-2 MV с 5% FBS. На 11-е, 15-е и 18-е сутки культивирования клетки снимали трипсином, часть из которых отбирали для анализа на проточном цитометре, а оставшиеся переносили в планшет для дальнейшего культивирования до достижения 70%-ной конfluence. Фенотип полученных колоний оценивали с помощью метода проточной цитометрии. Пробоподготовку цельной периферической крови, мононуклеарной фракции и культуры клеток проводили по двум панелям флуорохром-меченых моноклональных антител. Методом фазово-контрастной микроскопии визуально оценивали рост колоний. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0.

До 9-х суток колонии клеток не были визуально обнаружены. При дальнейшем культивировании формировались разрастающиеся колонии типа «булыжной мостовой». С помощью проточной цито-

---

**Адрес для переписки:**

*Торгунакова Евгения Александровна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, Россия, г. Кемерово, б-р имени академика  
Л.С. Барбараша, 6.  
Тел.: 8 (913) 400-09-96.  
E-mail: evgeniyatorgunakova@mail.ru*

**Address for correspondence:**

*Evgeniya A. Torgunakova  
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular  
Diseases  
6 Barbarash Blvd  
Kemerovo  
650002 Russian Federation  
Phone: +7 (913) 400-09-96.  
E-mail: evgeniyatorgunakova@mail.ru*

---

**Образец цитирования:**

*Е.А. Торгунакова, В.Г. Матвеева, Л.В. Антонова  
«Получение колониеформирующих клеток из  
крови человека и оценка чистоты популяции  
методом проточной цитометрии» // Российский  
иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 1. С. 43–48.  
doi: 10.46235/1028-7221-16987-IOC*

© Торгунакова Е.А. и соавт., 2025  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

*E.A. Torgunakova, V.G. Matveeva, L.V. Antonova “Isolation  
of colony-forming cells from human blood and evaluation  
of population purity by flow cytometry”, Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025,  
Vol. 28, no. 1, pp. 43–48.  
doi: 10.46235/1028-7221-16987-IOC*

© Torgunakova E.A. et al., 2025  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

**DOI:** 10.46235/1028-7221-16987-IOC

метрии детектировали две популяции: CD45<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup>. В ходе исследования было выявлено, что при увеличении длительности культивирования популяция CD45<sup>+</sup> уменьшалась, а CD45<sup>-</sup> прогрессивно увеличивалась, что может быть связано с постепенным вытеснением клеток гемопоэза эндотелиальными колониеформирующими клетками.

В результате нашего исследования, обнаруженная популяция CD45<sup>+</sup> соответствовала фенотипу клеток линии гемопоэза, тогда как популяция CD45<sup>-</sup> соответствовал эндотелиальный фенотип – CD31<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>vWF<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>. К 18-м суткам степень чистоты культуры составляла 97,6%.

*Ключевые слова: проточная цитометрия, эндотелиальные колониеформирующие клетки*

## ISOLATION OF COLONY-FORMING CELLS FROM HUMAN BLOOD AND EVALUATION OF POPULATION PURITY BY FLOW CYTOMETRY

Torgunakova E.A., Matveeva V.G., Antonova L.V.

*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation*

**Abstract.** Endothelial colony-forming cells (ECFCs) represent a rare population of circulating endothelial progenitor cells (EPCs), which is of interest for tissue engineering, cell therapy, and studying disorders associated with endothelial dysfunction. Advances in this field imply isolation and pure culturing of endothelial colony-forming cells, which may be obtained from the mononuclear fraction of human peripheral blood. Flow cytometry may provide rather accurate phenotyping and checking purity of the cell cultures. The aim of this study was to obtain a population of colony-forming endothelial cells evaluated by flow cytometry in order to confirm the phenotype and assess the purity of the cell populations. Heparinized donor blood from peripheral vein was used to obtain ECFCs. The mononuclear cell fraction was isolated on a Histopaque 1077 density gradient. The obtained cells were cultured in complete nutrient medium EGM-2 MV with 5% FBS. On the 11<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days of culture, the cells were detached with trypsin. Some cell aliquots were taken for flow cytometry, and the remaining cells were transferred to a plate for further cultivation until 70% confluency was reached. The phenotype of colonies obtained was evaluated by flow cytometry. Sample preparation of whole peripheral blood, mononuclear fraction and cell culture was performed using two panels of fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. Colony growth was visually evaluated by phase-contrast microscopy. Statistical processing of the obtained results was performed using the applied program package “Statistica 6.0”. Up to 9 days, the cell colonies were not detectable visually. During further cultivation, the proliferating colonies of the “cobblestone” type were formed. Two populations were detected by flow cytometry: CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup>. In the course of our study, it was revealed that, with increasing cultivation terms, a decrease of CD45<sup>+</sup> population was observed, along with progressive increase of CD45<sup>-</sup> cells, which may be associated with the gradual displacement of hematopoiesis cells by endothelial colony-forming cells. As a result of our study, the detected CD45<sup>+</sup> population had a phenotype of hematopoietic lineage cells, whereas the CD45<sup>-</sup> population exhibited endothelial phenotype: CD31<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>vWF<sup>+</sup>CD146<sup>+</sup>. By 18 days, the purity of culture reached 97.6%.

*Keywords: flow cytometry, endothelial colony-forming cells*

### Введение

Колониеформирующие эндотелиальные клетки (Endothelial Colony Forming Cells, ECFCs, КФЭК) представляют собой редкую популяцию поздних эндотелиальных клеток-предшественников (EPC), обладающих высоким пролиферативным потенциалом. В отличие от ранних эндотелиальных прогениторных клеток (eEPCs),

КФЭК способны непосредственно встраиваться в эндотелиальный слой поврежденных кровеносных сосудов, участвуя в процессе их регенерации. К тому же ранние эндотелиальные прогениторные клетки имеют гемопоэтическое происхождение, тогда как КФЭК считаются гомогенной популяцией истинных эндотелиальных прогениторов [1]. Они экспрессируют эндотелиальные маркеры, такие как CD31, VE-кадгерин, фактор

Виллебранда, CD146, VEGFR2, но не экспрессируют гемопоэтические маркеры CD45 и CD14. Эндотелиальные клетки, наряду с их прогениторами, играют важную роль в регуляции иммунного ответа, выступая в качестве активных участников острых или хронических воспалительных процессов, кроме того, они являются фагоцитирующими клетками [2].

КФЭК представляют интерес для многих приложений. КФЭК способны сформировать эндотелиальный монослой, который придаст функциональные свойства, улучшит тромбозостойкость и исход имплантации биоинженерных сердечно-сосудистых протезов [3, 4]. Научные исследования подтверждают, что клеточная терапия эндотелиальными прогениторными клетками ишемизированных тканей (например, при ишемической болезни сердца, инсульте и заболеваниях периферических артерий) способна улучшать процессы репарации, активизировать ангиогенез и снизить фиброзирование зоны повреждения [5, 6]. КФЭК могут выступать ценной моделью для изучения процессов ангиогенеза, эндотелиальной дисфункции и функционирования эндотелиального монослоя в норме и при ряде патологических состояний [7]. Реализация этих направлений подразумевает использование чистых культур эндотелиальных колониеформирующих клеток.

Эндотелиальные колониеобразующие клетки могут быть получены из моноклеарной фракции периферической крови, что подтверждается работами научных групп Medina, Colombo и др. [8, 9]. Проточная цитометрия является методом выбора для определения фенотипа полученной популяции клеток и оценки ее чистоты.

## Материалы и методы

Материалом для получения КФЭК служила донорская кровь из периферической вены, забранная с гепарином. Моноклеарную фракцию (MNF) выделяли на градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные из интерфазы клетки дважды промывали избытком PBS с последующим центрифугированием, суспензию клеток ресуспендировали в полной питательной среде EGM-2 MV (Lonza, Швейцария) с 5% FBS (HyClone, США), 2% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen, США) и 0,25 г/мл амфотерицина В (Invitrogen, США) и вносили на покрытые коллагеном культуральные планшеты 25 см<sup>2</sup>.

Культивирование проводили в инкубаторе при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. В первые 2 суток среду меняли

ежедневно для удаления неадгезированных клеток и дебриса, в последующем через 2-3 суток. На 11-е, 15-е и 18-е сутки культивирования клетки снимали трипсином. Часть клеток отбирали для анализа, оставшиеся переносили в планшет, покрытый фибронектином, и далее продолжали культивирование в полной питательной среде до формирования 70% конфлюентной культуры, после чего выполняли пассаж. Визуальный контроль за ростом культуры осуществляли ежедневно. Образцы оценивали методом фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе CarlZeiss.

### Проточная цитометрия

Клетки отмывали PBS и окрашивали конъюгированными моноклональными антителами фирмы BioLegend (если не указано иное): флуоресцеин-изотиоцианат (FITC) – (CD34, vWF (abcam)); фикоэритрин (PE) – (KDR (BD)); аллоцикоцианин (APC) – (CD133, CD31); фикоэритрин – цианин 7 (PC7) CD146; Krome Orange (KroOr) CD45 (BC).

Пробоподготовка цельной периферической крови, MNF и культуры клеток проводили согласно протоколам фирм-производителей по двум панелям:

1. CD34, KDR, CD146, CD133, CD31, CD45.
2. CD146, vWF.

В пробу вносили от 2 мкл до 20 мкл соответствующих антител с дальнейшей инкубацией 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Контролем служило внесение в образец равного объема антител соответствующего изотипического контроля, дальнейшую пробоподготовку выполняли аналогично основной пробе. Пробоподготовка крови дополнительно включала этапы лизирования эритроцитов раствором VersaLyse (BC) и отмывки образца PBS. При окрашивании внутриклеточного белка vWF выполняли фиксацию и пермеабиллизацию клеток с применением набора IntraPrep (BC). Окрашенные пробы ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном лазерном цитометре CytoFlex (США) в программе CytExpert. Настройку прибора для каждой панели выполняли с использованием контрольных проб, окрашенных соответствующими изотипами, дальнейший анализ всех образцов на единых настройках прибора. Для исключения дуплетов клеток и дебриса выделяли целевой гейт по FSC-A и FSC-H с переносом на гистограмму FSC/SSC для последующих этапов гейтирования. Оценивали процент позитивных клеток в популяции для каждого целевого маркера.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. Данные, имеющие нормальное распределение, представлены как среднее и стандартное отклонение, а в случае распределения, отличного от нормального – в виде медианы и квартилей (Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ ) %). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами в зависимости от характера распределения оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна–Уитни. Для проверки про-

стых гипотез использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона с поправкой Йейтса. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

До 8 суток клетки на культуральных планшетах визуально не детектировались. Через 10–18 дней зарегистрировано начало образования колоний с типичной морфологией «булыжной мостовой» (рис. 1А, Б). Пролиферирующие колонии сливались между собой, постепенно вытесняя остальные слабо адгезированные гемопоэтические клетки (рис. 1В).

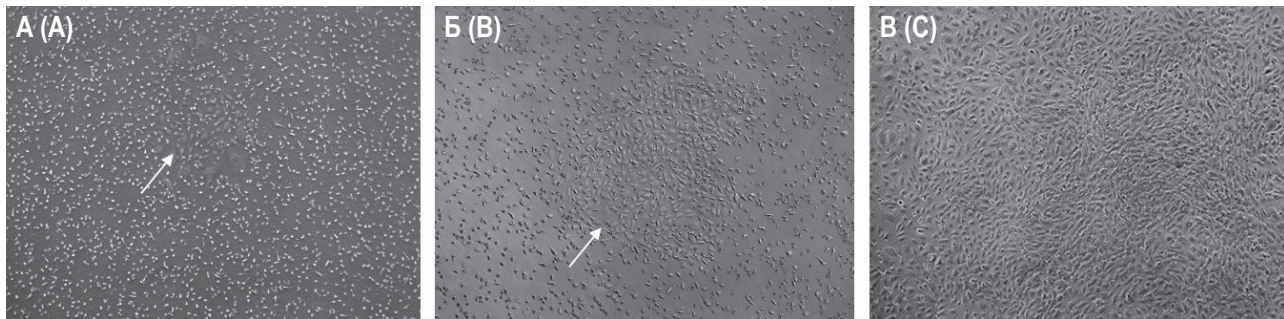


Рисунок 1. Типичный вид культур мононуклеаров периферической крови на 11-е сутки (А), 15-е сутки (Б) и 18-е сутки (В) культивирования (фазово-контрастная микроскопия, об  $\times 5$ )

Figure 1. Typical appearance of peripheral blood mononuclear cultures on day 11 (A), day 15 (B) and day 18 (C) of culturing (phase-contrast microscopy, vol  $\times 5$ )

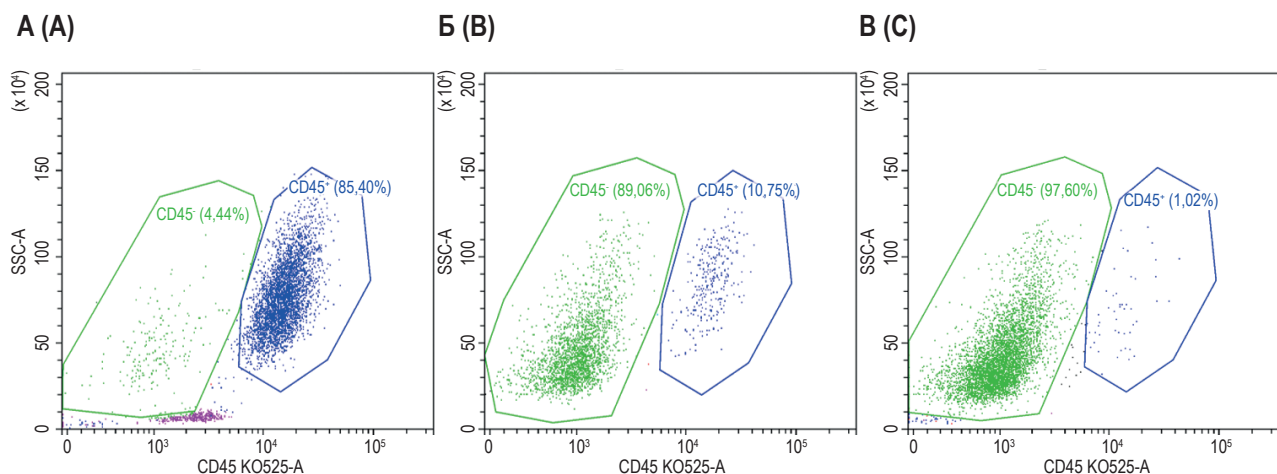


Рисунок 2. Типичные гистограммы распределения популяций CD45<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup> в культуре в зависимости от суток культивирования: А – 11 суток культивирования; Б – 15 суток культивирования; В – 18 суток культивирования (проточная цитометрия)

Figure 2. Typical histograms of CD45<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup> population distribution in culture depending on the day of cultivation: A, 11 days of cultivation; B, 15 days of cultivation; C, 18 days of cultivation (flow cytometry)

**ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИП ПОПУЛЯЦИИ CD45<sup>-</sup> НА РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ (ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ)**

TABLE 1. PHENOTYPE OF CD45<sup>-</sup> POPULATION AT DIFFERENT CULTURING TIMES (FLOW CYTOMETRY)

Популяция Population	Время культивирования Cultivation Period	CD34	CD309	CD146	CD133	CD31	vWF
CD45 <sup>-</sup>	7-11-е сут. 7-11 days	0,1 0,0-2,6	83,3 75,0-84,1	93,7 88,9-98,3	0 0,0-0,5	94 93,6-94,4	89,9 85,1-96,5
	13-19 сут. 13-19 days	9,1 1,9-26,7	78,8 61,8-88,7	99,6 97,1-99,9	0 0,0-0,7	99,2 98,4-99,9	95,5 90,7-98,3

Проточная цитометрия культуры детектировала присутствие двух популяций клеток: CD45<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup>. С увеличением суток культивирования количество клеток популяции CD45<sup>+</sup> снижалось, тогда как количество клеток CD45<sup>-</sup> прогрессивно увеличивалось, тем самым вытесняя клетки CD45<sup>+</sup>, популяцию, которая относится к клеткам гемопоэза. К 18-м суткам степень чистоты культуры по CD45<sup>-</sup> составляла 97,6% (рис. 2).

Фенотип популяции CD45<sup>-</sup> характеризовался максимальной экспрессией CD31<sup>+</sup> (99-100% позитивных клеток), CD144<sup>+</sup> (99-100% позитивных клеток) и vWF<sup>+</sup> (89,9-95,5%), присутствием молекул CD34<sup>+</sup> в 0,1-9,1% клеток и отсутстви-

ем линейного гемопоэтического маркера CD45 (табл. 1).

## Заключение

Таким образом, в процессе культивирования мононуклеарной фракции периферической крови была получена популяция клеток CD45<sup>-</sup>, которая обладала фенотипом эндотелиальных клеток (CD146<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD144<sup>+</sup>CD309<sup>+</sup>vWF<sup>+</sup>CD34<sup>+/+</sup>CD133<sup>-</sup>). После 10 суток культивирования наблюдалась естественная очистка культуры от гемопоэтических клеток (CD45<sup>+</sup>), к 18-м суткам чистота культуры достигала 96,7%.

## Список литературы / References

1. Banno K., Yoder M.C. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.*, 2018, Vol 83, no. 1-2, pp. 283-290.
2. Colombo E., Calcaterra F., Cappelletti M., Mavilio D., Della Bella S. Comparison of fibronectin and collagen in supporting the isolation and expansion of endothelial progenitor cells from human adult peripheral blood. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e66734. doi: 10.1371/journal.pone.0066734.
3. Go E., Yoder M.C. Identification of endothelial cells and their progenitors. *Methods Mol. Biol.*, 2021, no. 2206, pp. 27-37.
4. Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., Hebbel R.P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J. Clin. Invest.*, 2000, Vol. 105, no. 1, pp. 71-77.
5. 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. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 5, pp. 1316-1320.
6. Medina R.J., O'Neill C.L., Sweeney M., Guduric-Fuchs J., Gardiner T.A., Simpson D.A., Stitt A.W. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med. Genomics*, 2010, Vol. 3, 18. doi: 10.1186/1755-8794-3-18.

7. Melero-Martin J.M., Khan Z.A., Picard A., Wu X., Paruchuri S., Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 11, pp. 4761-4768.
8. Moubarik C., Guillet B., Youssef B., Codaccioni J.L., Piercecchi M.D., Sabatier F., Lionel P., Dou L., Foucault-Bertaud A., Velly L., Dignat-George F., Pisano P. Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke. *Stem Cell Rev. Rep.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 208-220.
9. Pober J.S., Sessa W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 10, pp. 803-815.

---

**Авторы:**

**Торгунакова Е.А.** — младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Матвеева В.Г.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

**Антонова Л.В.** — д.м.н., заведующая лабораторией клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

---

**Authors:**

**Torgunakova E.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Matveeva V.G.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

**Antonova L.V.**, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cell Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

---

Поступила 15.05.2024

Отправлена на доработку 20.05.2024

Принята к печати 31.07.2024

---

Received 15.05.2024

Revision received 20.05.2024

Accepted 31.07.2024