

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДИСТЫХ ГРАФТОВ НА ОСНОВАНИИ АНАЛИЗА ПРОФИЛЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

DOI: 10.17691/stm2022.14.3.02

УДК 576.3:004.891.3

Поступила 30.09.2021 г.



Е.А. Великанова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
М.Ю. Синицкий, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины;
А.В. Синицкая, к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины;
В.Г. Матвеева, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
М.Ю. Ханова, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий;
Л.В. Антонова, д.м.н., зав. лабораторией клеточных технологий

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Сосновый бульвар, 6, Кемерово, 650002

Цель исследования — оценка пригодности использования колониеформирующих эндотелиальных клеток для разработки тканеинженерных конструкций на основе изучения профиля генной экспрессии в сравнении со зрелыми эндотелиальными клетками.

Материалы и методы. Для эксперимента использовали колониеформирующие эндотелиальные клетки (endothelial colony-forming cells, ECFC), которые получали из периферической крови пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство. Клетки выделяли на градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США), затем культивировали в культуральной среде EGM-2MV (Lonza, Швейцария). В качестве контроля использовали коммерческую культуру первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC). Клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США).

Эксперимент выполняли в специализированных планшетах μ -Lug в перфузионной системе (IBIDI, Германия), обеспечивающей непрерывный однонаправленный поток культуральной среды с напряжением сдвига 5 дин/см². Контрольные планшеты культивировали в стандартных условиях за аналогичный промежуток времени. Проводили выделение тотальной РНК из клеточных образцов. Экспрессию генов *NOTCH4*, *NRP2*, *PLAT*, *PLAU*, *NOTCH1*, *FLT1*, *COL4A2*, *CD34*, *SERPINE1*, *HEY2*, *MKI67*, *KLF4*, *LYVE1*, *FLT4* оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по $\Delta\Delta C_t$ -методу, выражали на логарифмической (\log_{10}) шкале в виде кратного изменения относительно контрольных образцов.

Результаты. У зрелых эндотелиальных клеток HCAEC под воздействием ламинарного потока статистически значимо увеличились только значения транскрипционного фактора *KLF4* и маркера венозной дифференцировки *NRP2*. У ECFC наблюдали статистически значимое увеличение *KLF4*, *NRP2*, *CD34* и *LYVE1*, а также уменьшение экспрессии *PLAU*. При этом отмечали гиперэкспрессию *FLT4*, *LYVE1*, *NOTCH4* и *NRP2* в ECFC по отношению к HCAEC и гипоекспрессию *HEY2*. Также наблюдали характерную для прогениторных клеток гиперэкспрессию *CD34*. Характерной особенностью ECFC явилось увеличение экспрессии *COL4A2*, связанного с синтезом коллагена IV типа.

Заключение. Профиль генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток достаточно близок к таковому у первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, следовательно, полученные из периферической крови пациентов клетки могут быть использованы при разработке персонализированных тканеинженерных конструкций.

Для контактов: Великанова Елена Анатольевна, e-mail: velikanova_ea@mail.ru

Ключевые слова: колониеформирующие эндотелиальные клетки; мононуклеарная фракция периферической крови; эндотелиальные клетки коронарной артерии; генная экспрессия; тканевая инженерия.

Как цитировать: Velikanova E.A., Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Antonova L.V. Evaluation of the feasibility of endothelial colony-forming cells to develop tissue-engineered vascular grafts based on the gene expression profile analysis. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(3): 15, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.3.02>

English

Evaluation of the Feasibility of Endothelial Colony-Forming Cells to Develop Tissue-Engineered Vascular Grafts Based on the Gene Expression Profile Analysis

E.A. Velikanova, PhD, Researcher, Laboratory for Cell Technologies;
M.Yu. Sinitsky, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Genome Medicine;
A.V. Sinitskaya, PhD, Researcher, Laboratory of Genome Medicine;
V.G. Matveeva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Cell Technologies;
M.Yu. Khanova, Junior Researcher, Laboratory for Cell Technologies;
L.V. Antonova, MD, DSc, Head of Laboratory for Cell Technologies

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6 Sosnovy Blvd,
 Kemerovo, 650002, Russia

The aim of the study was to assess the suitability of endothelial colony-forming cells in the development of tissue engineering constructs based on the study of the gene expression profile compared to mature endothelial cells.

Materials and Methods. In the experiment, we used the endothelial colony-forming cells (ECFC) obtained from the peripheral blood of patients who underwent percutaneous coronary intervention. The cells were isolated on a Histopaque 1077 density gradient (Sigma-Aldrich, USA), and then cultured in EGM-2MV culture medium (Lonza, Switzerland). A commercial culture of primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) was used as a control. The cells were unfrozen and cultured according to the manufacturer's recommendations in MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, USA).

The experiment was carried out in specialized μ -Luer plates in the perfusion system (IBIDI, Germany), which provided a continuous unidirectional flow of the culture medium with a shear stress of 5 dyn/cm². Control plates were cultured under standard conditions for a similar period of time. Total RNA was isolated from cell samples. The expression of the genes *NOTCH4*, *NRP2*, *PLAT*, *PLAU*, *NOTCH1*, *FLT1*, *COL4A2*, *CD34*, *SERPINE1*, *HEY2*, *MKI67*, *KLF4*, *LYVE1*, *FLT4* was assessed using a quantitative real-time polymerase chain reaction. The expression of the genes was calculated by the Δ Ct method and expressed on a logarithmic (log₁₀) scale as a fold change relating to the control samples.

Results. In mature endothelial cells HCAEC when exposed to a laminar flow, only the transcription factor *KLF4* and venous differentiation *NRP2* marker values increased significantly. ECFC showed statistically significant growth in *KLF4*, *NRP2*, *CD34*, and *LYVE1*, as well as *PLAU* expression decrease. In addition, we observed the overexpression of *FLT4*, *LYVE1*, *NOTCH4*, and *NRP2* in ECFC in relation to HCAEC and *HEY2* hypoexpression. *CD34* overexpression characteristic of progenitor cells was also found. An increase in *COL4A2* expression associated with type IV collagen synthesis was a characteristic feature of ECFC.

Conclusion. The gene expression profile of endothelial colony-forming cells is quite close to that of primary endothelial cells of the human coronary artery, and thus, the cells obtained from patients' peripheral blood can be used to develop personalized tissue-engineered constructs.

Key words: endothelial colony-forming cells; mononuclear fraction of peripheral blood; coronary artery endothelial cells; gene expression; tissue engineering.

Введение

Формирование сосудистого протеза в условиях *in vitro* является одним из перспективных подходов к такому интенсивно развивающемуся направлению, как тканевая инженерия [1]. Данный подход предполагает культивирование клеточной массы на поверхности каркаса с образованием конструкта, пригодного для имплантации в кровеносное русло с целью замены

пораженного участка сосуда. Ключевыми вопросами при разработке данного метода являются выбор оптимального источника клеток; выбор материала и метода изготовления каркаса; определение условий культивирования, максимально соответствующих физиологическим.

В качестве возможного перспективного источника эндотелиальных клеток для использования в тканевой инженерии рассматривают эндотелиальные ко-

лониеформирующие клетки (endothelial colony-forming cells, ECFC) [2], обладающие высоким ангиогенным потенциалом [3, 4]. Как было показано в многочисленных исследованиях, ECFC могут быть выделены из большого числа источников, включая кровь [5, 6], костный мозг [7], жировую ткань [8], эмбриональные стволовые клетки [9] и многое другое. С точки зрения перспективы дальнейшего использования в клинической практике наибольшее внимание привлекает возможность дифференцировать ECFC из мононуклеарной фракции периферической крови. Преимуществом данного типа клеток по сравнению со зрелыми эндотелиальными клетками является их высокий пролиферативный потенциал [10], позволяющий получать большое количество клеточной массы, что очень важно при формировании тканеинженерных конструктов. При этом возможная гетерогенность ECFC из разных источников, а также влияние тканеинженерного носителя на их функциональные свойства требуют дальнейшего изучения.

Для успешной эндотелизации тканеинженерных сосудистых протезов необходимо создание максимально физиологических условий, включая действие на клетки напряжения сдвига. Воздействие на эндотелиальные клетки потока жидкости — необходимое условие для их нормальной жизнедеятельности и формирования эндотелиального монослоя [11]. В лабораторных условиях имитация пульсирующего потока достигается посредством использования насосов, создающих поток питательной среды с заданными параметрами, в том числе силой напряжения сдвига.

Целью нашего исследования явилось изучение профиля генной экспрессии ECFC в сравнении со зрелыми эндотелиальными клетками для оценки возможности их использования при разработке тканеинженерных сосудистых графтов.

Материалы и методы

Культивирование клеток. Данное исследование выполнено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013) и одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. На участие в исследовании получено информированное согласие пациентов.

Для эксперимента использовали ECFC, полученные из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца ($n=8$), перенесших чрескожное коронарное вмешательство. Выделение и обогащение ECFC проводили по модифицированному протоколу M. Kolbe с соавт. [12]. Мононуклеарную фракцию выделяли на градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, США), затем ресуспендировали в культуральной среде EGM-2MV (Lonza, Швейцария), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США), и высевали в покрытые коллагеном культуральные флаконы. После недели культивирования клетки

снимали с поверхности раствором аккутазы (Sigma-Aldrich) и пересевали в культуральные планшеты, покрытые фибронектином. Дальнейший пересев проводили по достижении 70–80% конfluence. На 19–22-й дни культивирования выполняли иммунофенотипирование и функциональный анализ полученной культуры.

В качестве контроля использовали коммерческую культуру первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) (Cell Applications, США). Согласно информации производителя, клетки были получены из артерий здоровых доноров с криоконсервацией на втором пассаже (500 000 клеток в базальной среде MesoEndo Cell Basal Medium (Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида). Клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications).

Для дальнейших экспериментов использовали клетки 6–8-го пассажей. Все манипуляции проводили в стерильных условиях, клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37 °C, 5% CO_2 .

Для проведения эксперимента культуры ECFC и HCAEC снимали с поверхности и засеивали в специализированные планшеты μ -Luer (IBIDI, Германия) в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл./мл и предкультивировали в инкубаторе в течение ночи для формирования монослоя. Затем часть планшетов подключали к насосу, обеспечивавшему непрерывный однонаправленный поток культуральной среды, и культивировали в течение 2 сут при напряжении сдвига 5 дин/см² (динамика). Остальные планшеты культивировали в стандартных условиях аналогичный промежуток времени (статика). После окончания культивирования анализировали экспрессию генов в изучаемых культурах.

Экспрессия генов. Из клеточных образцов выделяли тотальную РНК, по 4 репликаты на каждую линию клеток. После забора культуральной среды клетки промывали холодным фосфатно-солевым буфером, затем лизировали тризолом (Invitrogen, США). Выделение тотальной РНК осуществляли при помощи набора PureLink RNA Micro Scale Kit (Invitrogen) с сопутствующей обработкой ДНКазой (Sigma-Aldrich). Оценку количества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Экспрессию генов *NOTCH4*, *NRP2*, *PLAT*, *PLAU*, *NOTCH1*, *FLT1*, *COL4A2*, *CD34*, *SERPINE1*, *HEY2*, *MKI67*, *KLF4*, *LYVE1*, *FLT4* оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в режиме реального времени. Праймеры были синтезированы ЗАО «Евроген» (Москва), использованные последовательности праймеров приведены в таблице. Нормализацию результатов количественной ПЦР проводили с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH* и *B2M* в соответствии с общепринятыми реко-

Характеристика праймеров, использованных для проведения исследования

Ген	Последовательность
<i>NOTCH4</i>	Forward: 5'-ACA CAG GCT CCC GTT GTG AG-3' Reverse: 5'-GGC ACA CTC GTT GGT CTC CA-3'
<i>NRP2</i>	Forward: 5'-CTC GGC TTT TGC AGG TGA GAA T-3' Reverse: 5'-TGC TCC AGT CCA CCT CGT AT-3'
<i>PLAT</i>	Forward: 5'-TGG AGC AGT CTT CGT TTC GC-3' Reverse: 5'-CCA TGA CTG ATG TTG CTG GTA-3'
<i>PLAU</i>	Forward: 5'-CCT GGG TCG CTC AAG GCT TA-3' Reverse: 5'-CAC ACC TGC CCT CCT TGG AA-3'
<i>NOTCH1</i>	Forward: 5'-GCT CAC GCT GAC GGA GTA CA-3' Reverse: 5'-ATG GAA GCT GGG TGG GCA GT-3'
<i>FLT1</i>	Forward: 5'-ACG GCC AGC GAG TAC AAA G-3' Reverse: 5'-AGT CAC GTT TGC TCT TGA GG-3'
<i>COL4A2</i>	Forward: 5'-CAG GTT TTC CGG GAC TCC TG-3' Reverse: 5'-AAG GGT GTT GGC CTC TCC TG-3'
<i>CD34</i>	Forward: 5'-GTC TTC CAC TCG GTG CGT CT-3' Reverse: 5'-TGG GGT AGC AGT ACC GTT GT-3'
<i>SERPINE1</i>	Forward: 5'-CGC CGC CTC TTC CAC AAA TC-3' Reverse: 5'-AGG GCA GTT CCA GGA TGT CG-3'
<i>HEY2</i>	Forward: 5'-ACC TCC GAG AGC GAC ATG GA-3' Reverse: 5'-CGA TCC CGA CGC CTT TTC TC-3'
<i>MKI67</i>	Forward: 5'-GAC TTG ACG AGC GGT GGT TC-3' Reverse: 5'-GGG AAG GCC AGG TAT AAT CCG T-3'
<i>KLF4</i>	Forward: 5'-GAA AAG GAC CGC CAC CCA CA-3' Reverse: 5'-AGC GGG CGA ATT TCC ATC CA-3'
<i>LYVE1</i>	Forward: 5'-TGA AGG GGT AGG CAC GAT GG-3' Reverse: 5'-GCA TGA CAC CTG GAT GGA AAG C-3'
<i>FLT4</i>	Forward: 5'-TGT GGT CCT TTG GGG TGC TT-3' Reverse: 5'-CCC TCA TCC TTG TGC CGT CT-3'

KLF4 и маркера венозной дифференцировки *NRP2* ($p=0,03$) (рис. 1, а).

Реакция ECFC на действие напряжения сдвига была более выраженной. Как и в случае с HCAEC, наблюдали статистически значимое увеличение *KLF4* и *NRP2* ($p=0,03$) (рис. 1, б). Кроме того, отмечали увеличение маркеров *CD34* и лимфатической дифференцировки *LYVE1*, а также уменьшение экспрессии *PLAU* (урокиназный активатор плазминогена).

С учетом гетерогенности различных линий эндотелиальных клеток подробное изучение их секреторной активности, профиля генной экспрессии и особенностей реакции на специфические раздражители, такие как напряжение сдвига, может помочь при определении пригодности той или иной популяции эндотелиальных клеток к применению в тканевой инженерии сердца и сосудов. В качестве контроля в нашем эксперименте мы использовали линию зрелых эндотелиальных клеток артерии человека, предполагая, что сходство экспериментальной линии с данными клетками должно указывать на возможность их применения для решения задач тканевой инженерии.

Выявлено, что напряжение сдвига не вызывало значимых изменений в профиле HCAEC, за исключением увеличения экспрессии транскрипционного фактора *KLF4*, связанного с антитромботической и противовоспалительной функцией эндотелия, а также венозного эндотелиального маркера *NRP2*. Отсутствие выраженной реакции на ламинарный поток может быть в

мендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по ΔCt -методу, выражали на логарифмической (\log_{10}) шкале в виде кратного изменения относительно контрольных образцов.

Статистический анализ. Обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me [25%; 75%]). Сравнение групп проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали значения $p \leq 0,05$. При сравнении ECFC и HCAEC статистически значимые различия экспрессии генов определяли по кратности изменения (fold change) ≥ 2 .

Результаты и обсуждение

Установлено, что у зрелых эндотелиальных клеток HCAEC под воздействием ламинарного потока изменения генного профиля были незначительными. Так, статистически значимо увеличились только значения транскрипционного фактора

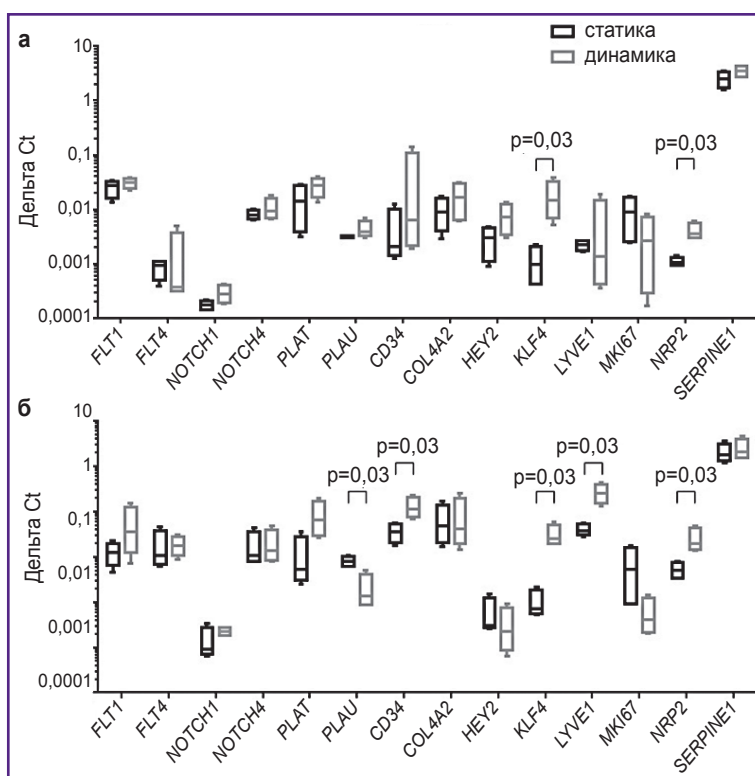


Рис. 1. Экспрессия генов в культуре ECFC (а) и HCAEC (б)

первую очередь связано с низким значением напряжения сдвига. В условиях эксперимента небольшое напряжение часто используется при выращивании в условиях *in vitro* тканеинженерных конструкций [13, 14]; однако в естественных условиях эндотелиальные клетки подвергаются напряжению сдвига 5–20 дин/см² [15]. Таким образом, использованное нами в эксперименте значение находится на нижней границе физиологической нормы.

ЕСFC проявляли бóльшую чувствительность к действию ламинарного потока. При этом примечательным представляется тот факт, что наряду с увеличением экспрессии венозного эндотелиального маркера *NRP2* значительно возрастала экспрессия *LYVE1*, связанного с дифференцировкой лимфатического эндотелия. Кроме того, напряжение сдвига вызывало уменьшение экспрессии *PLAU*, являющегося компонентом фибринолитической системы, но не *PLAT*, который также задействован в процессе фибринолиза. Ранее эффект гипозэкспрессии *PLAU* при нормальном значении напряжения сдвига по отношению к статическому культивированию был показан для зрелых эндотелиальных клеток [16]. В нашем эксперименте данный эффект отмечался только для ЕСFC, что может быть связано с более низкими параметрами потока и, по-видимому, свидетельствует о большей чувствительности незрелых эндотелиальных клеток к изменению динамического воздействия.

Все изученные гены были разделены на три группы, в зависимости от характера изменения их экспрессии в ЕСFC по сравнению с НСАЕС: гены с повышенной экспрессией, гены без изменения уровня экспрессии и гены с пониженной экспрессией (рис. 2).

Сравнение профиля генной экспрессии ЕСFC и НСАЕС в статических условиях культивирования подтвердило эндотелиальный фенотип ЕСFC, но при этом продемонстрировало его переходный харак-

тер, что проявлялось в гиперэкспрессии маркеров лимфатической эндотелиальной дифференцировки *LYVE1* и *FLT4*, гиперэкспрессии маркера *NOTCH4*, связанного с фенотипом артериальных эндотелиальных клеток, и гиперэкспрессии маркера венозной дифференцировки *NRP2* в сочетании с ярко выраженным снижением экспрессии маркера артериальной дифференцировки *HEY2*. Также отмечалась характерная для прогениторных клеток гиперэкспрессия *CD34*. Характерной особенностью ЕСFC явилось увеличение экспрессии *COL4A2*, связанного с синтезом коллагена IV типа.

Под действием напряжения сдвига указанные тенденции в целом сохраняются. При этом культивирование в ламинарном потоке способствовало увеличению различий фенотипа: при сохранении уровня экспрессии панэндотелиального маркера *FLT1* отмечалась гипозэкспрессия *NOTCH4*. Также наблюдали гиперэкспрессию *KLF4*, что согласуется с данными о влиянии этого транскрипционного фактора на сигнальный путь Notch [17]. Несмотря на то, что *KLF4* ассоциирован с дифференцировкой эндотелиальных клеток [17], при сохранении соотношений в экспрессии маркеров венозной и лимфатической дифференцировки изменение экспрессии *NOTCH4* может говорить о негативном влиянии низкого значения напряжения сдвига на артериальную дифференцировку ЕСFC.

Известно, что ЕСFC могут быть дифференцированы из большого числа различных источников [5–9]. При этом не до конца изучены особенности ЕСFC различного происхождения, так же как и их реакция на воздействие специфических раздражителей. Исследования показывают, что реакция ЕСFC на напряжение сдвига в целом оказывается сходной с таковой у зрелых эндотелиальных клеток [18]. В нашем исследовании профиль ЕСFC, полученных из периферической крови пациентов с ИБС, оказался близким к НСАЕС, однако наблюдались различия в уровне экспрессии отдельных генов, связанных с дифференцировкой различных эндотелиальных линий, которые усиливались под действием ламинарного потока. Расхождения с исследованиями, которые связывают усиление экспрессии маркеров зрелого эндотелия в условиях динамического культивирования в эндотелиальных прогениторных и колониеформирующих клетках с воздействием напряжения сдвига [19], могут быть объяснены в первую очередь различным происхождением клеток, а также отличающимися условиями культивирования и параметрами потока в разных экспериментах.

В ряде исследований проводили успешную эндотелизацию поверхности тканеинженерных скаффолдов с использованием низких значений напряжения сдвига [19, 20]. Подобный подход позволяет за счет щадящих условий культивирования избежать нарушения формирующегося эндотелиального слоя под воздействием потока. Тем не менее получен-

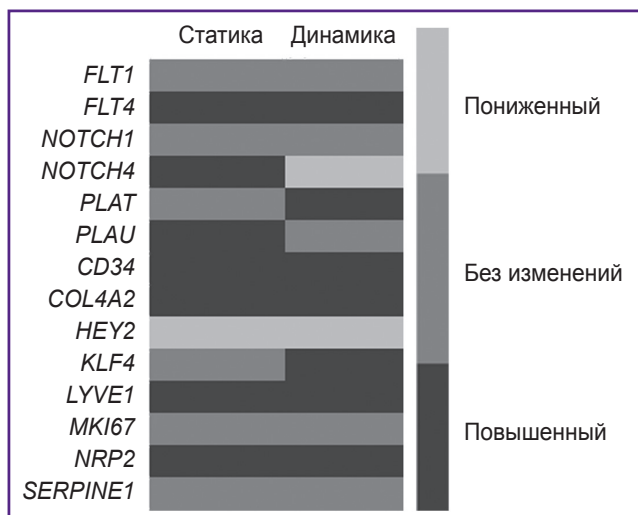


Рис. 2. Уровень генной экспрессии в культуре ЕСFC по сравнению с НСАЕС

ные нами данные свидетельствуют о необходимости тщательного подбора режимов культивирования, по крайней мере при использовании ECFC, которые будут способствовать формированию зрелого эндотелиального фенотипа клеток.

Заключение

Результаты исследования позволяют утверждать, что профиль генной экспрессии ECFC достаточно близок к профилю HCAEC и, таким образом, полученные из периферической крови пациентов ECFC могут быть использованы при разработке персонифицированных тканеинженерных сосудистых графтов. В то же время необходимо проведение дальнейших исследований по определению особенностей реакции ECFC на напряжение сдвига разной величины, поскольку эти данные могут быть важны для определения оптимальных условий при формировании тканеинженерных конструкций.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований Сибирского отделения РАН в рамках фундаментальной темы Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода, с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Mallis P., Kostakis A., Stavropoulos-Giokas C., Michalopoulos E. Future perspectives in small-diameter vascular graft engineering. *Bioengineering (Basel)* 2020; 7(4): 160, <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040160>.
- Paschalaki K.E., Randi A.M. Recent advances in endothelial colony forming cells toward their use in clinical translation. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: 295, <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00295>.
- Prasain N., Lee M.R., Vemula S., Meador J.L., Yoshimoto M., Ferkowicz M.J., Fett A., Gupta M., Rapp B.M., Saadatizadeh M.R., Ginsberg M., Elemento O., Lee Y., Voytik-Harbin S.L., Chung H.M., Hong K.S., Reid E., O'Neill C.L., Medina R.J., Stitt A.W., Murphy M.P., Rafii S., Broxmeyer H.E., Yoder M.C. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32(11): 1151–1157, <https://doi.org/10.1038/nbt.3048>.
- Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109(5): 1801–1809, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043471>.
- Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Hao X., Lv J., Ma N., Li W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev* 2015; 44(15): 5680–5742, <https://doi.org/10.1039/c4cs00483c>.
- Ingram D.A., Mead L.E., Tanaka H., Meade V., Fenoglio A., Mortell K., Pollok K., Ferkowicz M.J., Gilley D., Yoder M.C. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104(9): 2752–2760, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1396>.
- Solomon I., O'Reilly M., Ionescu L., Alphonse R.S., Rajabali S., Zhong S., Vadivel A., Shelley W.C., Yoder M.C., Thébaud B. Functional differences between placental micro- and macrovascular endothelial colony-forming cells. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(3): 291–300, <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0162>.
- Yu S., Li Z., Zhang W., Du Z., Liu K., Yang D., Gong S. Isolation and characterization of endothelial colony-forming cells from mononuclear cells of rat bone marrow. *Exp Cell Res* 2018; 370(1): 116–126, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.06.013>.
- Alphonse R.S., Vadivel A., Zhong S., McConaghy S., Ohls R., Yoder M.C., Thébaud B. The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs. *Nat Protoc* 2015; 10(11): 1697–1708, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.107>.
- Joo H.J., Song S., Seo H.R., Shin J.H., Choi S.C., Park J.H., Yu C.W., Hong S.J., Lim D.S. Human endothelial colony forming cells from adult peripheral blood have enhanced sprouting angiogenic potential through up-regulating VEGFR2 signaling. *Int J Cardiol* 2015; 197: 33–43, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.06.013>.
- Nayak L., Lin Z., Jain M.K. “Go with the flow”: how Krüppel-like factor 2 regulates the vasoprotective effects of shear stress. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(5): 1449–1461, <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3647>.
- Kolbe M., Dohle E., Katerla D., Kirkpatrick C.J., Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods* 2010; 16(5): 877–886, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2009.0492>.
- Liu H., Gong X., Jing X., Ding X., Yao Y., Huang Y., Fan Y. Shear stress with appropriate time-step and amplification enhances endothelial cell retention on vascular grafts. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(11): 2965–2978, <https://doi.org/10.1002/term.2196>.
- Melchiorri A.J., Bracaglia L.G., Kimerer L.K., Hibino N., Fisher J.P. In vitro endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods* 2016; 22(7): 663–670, <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0562>.
- Fisher A.B., Chien S., Barakat A.I., Nerem R.M. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(3): L529–L533, <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.3.L529>.
- Dolan J.M., Sim F.J., Meng H., Kolega J. Endothelial cells express a unique transcriptional profile under very high wall shear stress known to induce expansive arterial

remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302(8): C1109–C1118, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00369.2011>.

17. Hale A.T., Tian H., Anih E., Recio F.O. III, Shatat M.A., Johnson T., Liao X., Ramirez-Bergeron D.L., Proweller A., Ishikawa M., Hamik A. Endothelial Krüppel-like factor 4 regulates angiogenesis and the notch signaling pathway. *J Biol Chem* 2014; 289(17): 12016–12028, <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.530956>.

18. Egorova A.D., DeRuiter M.C., Boer H.C., Pas S., Gittenberger-de Groot A.C., Zonneveld A.J., Poelmann R.E., Hierck B.P. Endothelial colony-forming cells show a mature transcriptional response to shear stress. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*

2012; 48(1): 21–29, <https://doi.org/10.1007/s11626-011-9470-z>.

19. Cui X., Zhang X., Guan X., Li H., Li X., Lu H., Cheng M. Shear stress augments the endothelial cell differentiation marker expression in late EPCs by upregulating integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425(2): 419–425, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.115>.

20. Tondreau M.Y., Laterreur V., Gauvin R., Vallières K., Bourget J.M., Lacroix D., Tremblay C., Germain L., Ruel J., Auger F.A. Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. *Acta Biomater* 2015; 18: 176–185, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.026>.