

doi 10.18699/vjgb-26-40

# Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi014-A и RCPMi014-B из Т-лимфоцитов здорового донора и верификация их моноклонального происхождения по V(D)J-перестройкам генов TCR

Д.К. Шерман <sup>1&</sup>, М.Е. Богомякова <sup>1, 2&</sup>, Э.А. Кастуева <sup>1</sup>, И.В. Звягин <sup>3</sup>, В.К. Руппель<sup>3, 4</sup>, Е.В. Барсова <sup>3, 4</sup>, А.Ю. Горбачев <sup>1</sup>, Н.А. Кулемин <sup>1</sup>, А.А. Баринаева <sup>1</sup>, Е.А. Зеркаленкова <sup>5, 6</sup>, А.Н. Богомазова <sup>1, 2</sup>, М.А. Лагарькова <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия


<sup>2</sup> Центр «Генетическое репрограммирование и генная терапия» Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

<sup>3</sup> Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>4</sup> ООО «Майлаборатори», Москва, Россия

<sup>5</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>6</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

 dar.sher.man0@gmail.com

**Аннотация.** Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из Т-лимфоцитов периферической крови представляет собой перспективную альтернативу использованию фибробластов кожи. Этот подход сочетает минимально инвазивный забор биоматериала совместно с быстрым получением обогащенной популяции целевых клеток. Дополнительным преимуществом является относительно низкий мутационный груз Т-лимфоцитов по сравнению с традиционным источником соматических клеток для репрограммирования – фибробластами кожи, ввиду того что Т-лимфоциты защищены от хронического воздействия ультрафиолетового излучения – одного из ключевых факторов накопления соматических мутаций. Объективная верификация моноклональности полученных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток возможна благодаря наличию V(D)J-перестроек генов Т-клеточного рецептора, формирующихся в результате соматической рекомбинации в тимусе в процессе естественного созревания Т-лимфоцитов. Эти перестройки остаются неизменными при репрограммировании и служат уникальным маркером, позволяющим достоверно идентифицировать моноклональные линии и исключать контаминированные линии или линии поликлонального происхождения. Надежная верификация клонального происхождения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток может быть важной в экспериментах, предъявляющих высокие требования к генетической однородности. Данная работа посвящена созданию и комплексной характеристике моноклональных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из CD3+ Т-лимфоцитов здорового донора методом эписомного репрограммирования. Полученные линии RCPMi014-A (PBM022E5) и RCPMi014-B (PBM022E7) соответствуют принятым критериям качества для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: они демонстрируют экспрессию ключевых маркеров плюрипотентности (OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81), способность к дифференцировке в производные всех трех зародышевых листков и обладают нормальным кариотипом. Обе линии показали способность к дифференцировке в definitivoную эндодерму с высокой эффективностью, оцененной по экспрессии CXCR4, что определяет их перспективность для разработки протоколов генерации β-клеток поджелудочной железы. Полученные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток могут быть использованы для фундаментальных исследований механизмов плюрипотентности и дифференцировки, а также для создания изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с внесенными мутациями при моделировании редких наследственных заболеваний.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; Т-лимфоциты; репрограммирование; Т-клеточный рецептор; клон клеток; V(D)J-рекомбинация; definitivoная эндодерма

**Для цитирования:** Шерман Д.К., Богомякова М.Е., Кастуева Э.А., Звягин И.В., Руппель В.К., Барсова Е.В., Горбачев А.Ю., Кулемин Н.А., Баринаева А.А., Зеркаленкова Е.А., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi014-A и RCPMi014-B из Т-лимфоцитов здорового донора и верификация их моноклонального происхождения по V(D)J-перестройкам генов TCR. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(2):362-371. doi 10.18699/vjgb-26-40

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 годы, соглашение № 075-15-2025-518).

# Generation of the RCPCMi014-A and RCPCMi014-B lines from T-lymphocytes of a healthy donor and verification of their monoclonal origin by TCR V(D)J rearrangement analysis

D.K. Sherman <sup>1</sup> & , M.E. Bogomiakova <sup>1, 2</sup> &\*, E.A. Kastueva <sup>1</sup>, I.V. Zvyagin <sup>3</sup>, V.K. Ruppel<sup>3, 4</sup>, E.V. Barsova <sup>3, 4</sup>, A.Y. Gorbachev <sup>1</sup>, N.A. Kulemin <sup>1</sup>, A.A. Barinova <sup>1</sup>, E.A. Zerkalenkova <sup>5, 6</sup>, A.N. Bogomazova <sup>1, 2</sup>, M.A. Lagarkova <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia


<sup>2</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>4</sup> LLC “MiLaboratori”, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

 dar.sher.man0@gmail.com

**Abstract.** The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from peripheral blood T-lymphocytes offers a promising alternative to skin fibroblasts. This approach combines minimally invasive sample collection with rapid isolation of enriched target cell population and provides a lower baseline mutational burden, as T-lymphocytes are shielded from chronic ultraviolet radiation – a major driver of somatic mutations in skin fibroblasts. Objective verification of monoclonality of the resulting iPSC lines is possible due to V(D)J rearrangements in T-cell receptor (TCR) genes, which are formed as a result of somatic recombination in the thymus during the natural maturation of T-lymphocytes. These rearrangements remain unchanged during reprogramming and serve as a unique marker, allowing for reliable identification of monoclonal lines and exclusion of contaminated or polyclonal lines. Reliable verification of the clonal origin of iPSCs can be crucial in experiments that place high demands on genetic homogeneity. This work is dedicated to the generation and comprehensive characterization of monoclonal iPSC lines derived from CD3+ T-lymphocytes of a healthy donor using episomal reprogramming. The resulting lines, RCPCMi014-A (PBM022E5) and RCPCMi014-B (PBM022E7), meet the accepted quality criteria for iPSCs: they demonstrate expression of key pluripotency markers (OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81), the ability to differentiate into derivatives of all three germ layers, and possess a normal karyotype. Both lines showed a high-efficiency capacity to differentiate into definitive endoderm, as assessed by CXCR4 expression, highlighting their potential for developing protocols to generate pancreatic  $\beta$ -cells. The obtained iPSC lines can be used for fundamental research into the mechanisms of pluripotency and differentiation, as well as for creating isogenic iPSC lines with introduced mutations for modeling rare hereditary diseases.

**Key words:** induced pluripotent stem cells; T-lymphocytes; reprogramming; T-cell receptor; cell clone; V(D)J recombination; definitive endoderm

**For citation:** Sherman D.K., Bogomiakova M.E., Kastueva E.A., Zvyagin I.V., Ruppel V.K., Barsova E.V., Gorbachev A.Y., Kulemin N.A., Barinova A.A., Zerkalenkova E.A., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Generation of the RCPCMi014-A and RCPCMi014-B lines from T-lymphocytes of a healthy donor and verification of their monoclonal origin by TCR V(D)J rearrangement analysis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(2):362-371. doi 10.18699/vjgb-26-40

## Введение

Открытие технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) в 2006 г. открыло новые возможности в регенеративной медицине и биомедицинских исследованиях (Yamanaka, 2020). Благодаря способности дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков, ИПСК обладают значительным потенциалом для моделирования заболеваний *in vitro*, позволяя изучать тканеспецифические патологические процессы на клеточном уровне (Summers et al., 2024). При создании таких моделей, как правило, используют ИПСК, полученные от пациентов с наследственными заболеваниями (Grigor'eva et al., 2023), что позволяет воссоздать индивидуальные особенности болезни. В подобных исследованиях линии от здоровых доноров служат важным референсным контролем. Особую актуальность они приобретают при изучении орфанных заболеваний, где крайне малая численность пациентов затрудняет прямое получение клеточных моделей. В таких случаях перспективным решением будет создание изогенных пар методом геном-

ного редактирования на основе ИПСК здоровых доноров (Хомякова и др., 2023; Федоренко и др., 2024). Важно отметить, что ИПСК от здоровых доноров также представляют собой незаменимый ресурс для стандартизации протоколов дифференцировки, разработки «универсальных» клеточных продуктов и изучения базовых механизмов репрограммирования (Cerneckis et al., 2024).

Согласно общепринятой практике каждая морфологически однородная колония ИПСК считается клоном, происходящим из единственной репрограммированной клетки-предшественницы (Takahashi et al., 2007). В соответствии с этой практикой отдельные колонии культивируются независимо и рассматриваются как индивидуальные клеточные линии. Однако прямое подтверждение моноклональности редко осуществляется: отсутствие методов верификации означает, что поликлональные линии могут оставаться незамеченными, особенно если колонии сформировались в результате близкого расположения клеток. Аутентификация клеточных линий, включая подтверждение генетической принадлежности и отсутствие кон-

таминации, является критически важной лабораторной процедурой для обеспечения воспроизводимости научных исследований, минимизации финансовых потерь и поддержания достоверности получаемых данных (Harbut et al., 2024).

В этом контексте уникальное преимущество ИПСК, полученных из Т-лимфоцитов, состоит в возможности верификации моноклонального происхождения с помощью анализа геномных перестроек, возникающих в ходе V(D)J-рекомбинации при формировании зрелых генов цепей Т-клеточного рецептора (TCR) (Kishino et al., 2014). Эта клон-специфичная перестройка, сохраняющаяся после репрограммирования, служит молекулярным «баркодом» исходной Т-клетки. Современные подходы к анализу V(D)J-перестроек, включая мультиплексную ПЦР (Seki et al., 2010) и таргетное высокопроизводительное секвенирование (Nishimura et al., 2013), делают возможным прямое выявление поликлонального происхождения, что особенно важно для обеспечения воспроизводимости и достоверности результатов в биомедицинских исследованиях. Сочетание объективной верификации клональности и малоинвазивности получения биоматериала делает использование Т-лимфоцитов привлекательной стратегией для получения ИПСК как в фундаментальных исследованиях, так и при создании клеточных моделей заболеваний.

В настоящей работе методом эписомного репрограммирования получены линии ИПСК из Т-лимфоцитов здорового донора. Впервые с помощью анализа V(D)J-перестроек трех геномных локусов были исключены поликлональные популяции, что позволило достоверно идентифицировать моноклональные линии. Линии ИПСК с подтвержденным моноклональным происхождением RCPcMi014-A (PBM022E5) и RCPcMi014-B (PBM022E7) продемонстрировали полное соответствие критериям качества: сохранение нормального кариотипа, экспрессию ключевых маркеров (OCT4, SOX2, SSEA-4, TRA-1-81) и способность к дифференцировке в производные всех трех зародышевых листков, и, в частности, высокую эффективность направленной дифференцировки в дефинитивную эндодерму.

## Материал и методы

**Этические аспекты исследования и забор биологического материала.** Исследование проведено в соответствии с этическими нормами и одобрено этическим комитетом Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол № 1 от 01.06.2021). Биологический материал (периферическая венозная кровь) был получен от добровольца-донора мужского пола в возрасте 35 лет. Забор крови осуществлял квалифицированный медицинский персонал поликлиники ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России с соблюдением всех стандартных медицинских процедур. Перед проведением процедуры донор был проинформирован о целях исследования и добровольно подписал информированное согласие на использование его биологического материала в научных целях.

**Экзомное секвенирование и биоинформатический анализ.** Геномную ДНК выделяли из замороженных образцов цельной крови с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells (Евроген). Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI), обогащение экзомных регионов проводили с помощью панели VAHTS Target Capture Core Exome Panel (Vazyme) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование полученных библиотек выполняли на платформе MGISEQ-2000 (MGI) в парно-конечном режиме (paired-end) для достижения среднего покрытия ~80× (не менее 30 млн парных прочтений на образец).

Первичный биоинформатический анализ включал контроль качества сырых прочтений с помощью FastQC, в ходе которого низкокачественные прочтения и адаптерные последовательности были отфильтрованы. Выравнивание прочтений на референсный геном человека GRCh37/hg19 проводили с использованием алгоритма BWA-MEM. Качество выравнивания и эффективность обогащения оценивали с помощью пакетов SAMtools, mosdepth и Picard Tools. Выявление однонуклеотидных вариантов и небольших инделов (SNV/InDel) выполняли с использованием программного пакета DeepVariant.

**Выделение и активация Т-лимфоцитов.** Моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из венозной крови методом градиентного центрифугирования, применяя коммерческий реагент NycosPrep™ (Axis-Shield) согласно стандартному протоколу (Григорьева и др., 2024). CD3+ Т-клетки выделяли из полученной фракции PBMC методом магнитной сепарации с использованием набора Human CD3+ Cell Separation Kit (RWD) в соответствии с инструкцией производителя. Активацию Т-лимфоцитов проводили по модифицированному двух-этапному протоколу (Maslennikova et al., 2022). На первом этапе клетки инкубировали с магнитными частицами Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco). На следующий день частицы удаляли с помощью магнитного штатива, после чего клетки ресуспендировали в среде для Т-клеток: RPMI-1640 (ПанЭко), дополненной 10 % термоинактивированной HI-FBS (BioFroxx) и 100 МЕ/мл IL-2 (Биотех НПК), в концентрации  $0.5 \times 10^6$  клеток/мл и культивировали дополнительно 24 ч.

**Репрограммирование Т-клеток и культивирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.** Репрограммирование Т-клеток проводили методом трансфекции эписомными векторами (Okita et al., 2013), экспрессирующими факторы репрограммирования SOX2, OCT4, KLF4, L-MYC, LIN28, доминантно-негативную форму мышинового белка p53 (mp53DD) и фактор поддержания эписом – белок EBNA1 (Addgene #41813-14, 41855-57). Трансфекцию проводили с использованием системы Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) со стандартными параметрами: 1650 В–10 мс–3 пульса. В качестве контроля эффективности трансфекции использовали плазмиду pCE-GFP (Addgene #41858). Через 24 ч после электропорации с помощью проточного цитометра

NovoCyte (ACEA Biosciences) подсчитывали количество живых, DAPI-негативных активированных бластных клеток (бластов), характеризующихся увеличением размеров (FSC) и гранулярности (SSC). Клеточную суспензию высевали на 35-мм чашки Петри, предварительно покрытые Матригелем (Corning) в разведении 1:50, исходя из плотности  $10\text{--}12 \times 10^3$  жизнеспособных бластов/см<sup>2</sup> в среде для Т-клеток. На следующий день к культуральной среде добавляли равный объем среды для репрограммирования следующего состава: ReproTeSR™ medium (Stemcell Technologies), 100 нг/мл FGF2 (собственное производство ФНКЦ ФХМ), 10 мкМ ингибитора ROCK (Ri) – Y-27632, 0,5 мкМ PD0325901 и 2 мкМ SB431542 (все – DC Chemicals, Китай). В дальнейшем среду для репрограммирования заменяли через день. На 16-е сутки клетки переводили на модифицированную среду для ИПСК, состоящую из смеси ГибриС-8 (ПанЭко) и mTeSR1 (Stemcell Technologies) в соотношении 4:1, с ежедневной заменой среды. На 26-е сутки проводили механический отбор сформировавшихся колоний с использованием 0,1 % раствора диспазы (Invitrogen). Полученные клоны ИПСК культивировали в бесфидерных условиях по ранее описанному протоколу (Goliusova et al., 2025).

**Анализ интеграции трансгенных конструкций методом кПЦР в реальном времени.** Для оценки возможной интеграции эписомных векторов в геном линии ИПСК культивировали не менее 10 пассажей. Далее выделяли геномную ДНК с использованием набора М-Сорб (Синтол). Анализ интеграции трансгенных конструкций выполняли методом кПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) с использованием 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген) и специфических праймеров (табл. S1 Приложения)<sup>1</sup>. Программа амплификации: 95 °С – 4 мин; 40 циклов: 95 °С – 10 с, 60 °С – 40 с (детекция флуоресценции); анализ плавления продукта: 95 °С – 5 с, 65 °С – 5 с (с непрерывным измерением флуоресценции), 95 °С – 50 с.

**Анализ последовательностей участков V(D)J-перестроек.** С целью определения клонального состава линий ИПСК проводили анализ последовательностей трех геномных локусов, формируемых в результате V(D)J-рекомбинации, определяющих последовательность зрелых генов  $\alpha/\delta$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей TCR. Библиотеки для высокопроизводительного секвенирования готовили из 42 нг геномной ДНК (эквивалент ~6500 диплоидных геномов) с использованием набора «Human IG/TCR DNA Multiplex Kit 7G» (Майлаборатори) в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование выполняли на платформе Illumina MiSeq в режиме парного чтения, с длиной каждого прочтения 150 п. н. В результате было получено не менее 90 тыс. парных чтений для каждого образца.

Биоинформатический анализ данных проводили с помощью программного пакета MiXCR (<https://mixcr.com>). Не менее 83 % прочтений в каждом образце были успешно идентифицированы как содержащие последовательность, однозначно атрибутируемую к одному из исследуемых ло-

кусов по результатам сопоставления с референсными последовательностями соответствующих локусов с помощью ПО MiXCR. Для определения клональности исследовали распределение представленности по количеству прочтений и предполагаемую функциональность идентифицированных последовательностей V(D)J-перестроек в каждом из трех локусов. В анализ включались перестройки, подержанные не менее чем 100 независимыми прочтениями.

**Скрининг микоплазменной инфекции.** Отсутствие контаминации микоплазмой было подтверждено методом ПЦР с использованием праймеров на ген рибосомной 16S РНК (см. табл. S1), как описано ранее (Goliusova et al., 2024).

**Выделение РНК и ОТ-ПЦР.** Тотальную РНК выделяли из 1 млн клеток с помощью реагента Extract RNA (Евроген) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген) и случайных декануклеотидных праймеров. ОТ-ПЦР проводили с использованием специфических праймеров (см. табл. S1). Программа амплификации: 95 °С – 3 мин; 32 цикла: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с, 72 °С – 30 с; финальная элонгация: 72 °С – 5 мин.

**Кариотипирование** выполняли согласно ранее описанной методике с разрешением 400 бэндов (Goliusova et al., 2024).

**STR анализ для аутентификации клеточных линий.** STR-профилирование выполняли с коммерческим набором COrDIS Plus (Гордиз), позволяющим анализировать 19 аутосомных локусов и половой маркер Amelogenin.

**Анализ экспрессии маркеров плюрипотентности методом проточной цитометрии.** Проточную цитометрию выполняли в соответствии с ранее описанной методикой (Хомякова и др., 2023). Антитела, использованные в работе, см. в табл. S2.

**Иммуноцитохимическое окрашивание.** Иммуноцитохимическое окрашивание проводили согласно ранее опубликованному протоколу (Федоренко и др., 2024). Антитела, использованные в работе, представлены в табл. S2. Визуализацию проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX53F. Обработку полученных изображений выполняли с применением программного обеспечения GIMP-2.10.

**Функциональная оценка плюрипотентности методом спонтанной дифференцировки.** Для подтверждения плюрипотентного статуса ИПСК проводили тест на способность к спонтанной дифференцировке в производные трех зародышевых листков по ранее описанному протоколу (Goliusova et al., 2024). Через 15–20 дней адгезионного культивирования эмбрионидные тельца фиксировали в 4 % PFA и окрашивали на специфические маркеры трех зародышевых листков (см. табл. S2).

**Дифференцировка в дефинитивную эндодерму.** Дифференцировку в дефинитивную эндодерму проводили с помощью набора STEMdiff™ Definitive Endoderm Kit (STEMCELL Technologies) согласно протоколу производителя. Эффективность дифференцировки оценивали по экспрессии маркера CXCR4 с помощью антител, представленных в табл. S2.

<sup>1</sup> Табл. S1–S3 и рис. S1 Приложения доступны по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx21.pdf>

## Результаты и обсуждение

Наша работа посвящена получению и детальной характеристике линий ИПСК, полученных из Т-лимфоцитов здорового донора. Полноэкзомное секвенирование донора не выявило патогенных или предположительно патогенных вариантов в генах, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, согласно базе данных PanelApp (Martin et al., 2019) и руководствам ACMG (Richards et al., 2015). Схема репрограммирования представлена на рис. 1, а. CD3+ Т-лимфоциты, выделенные из периферической крови, активировали с использованием CD3/CD28 Dynabeads™ и трансфицировали коктейлем эписомных плазмид, кодирующих *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *LIN28*, *EBNA1* и *mp53DD*. Через 24 ч после трансфекции клетки высевали на чашки, покрытые Matrigel®, и культивировали в среде, дополненной комбинацией малых молекул: Y-27632 (ROCK-ингибитор), SB431542 (ингибитор TGF-β) и PD0325901 (MEK-ингибитор), что повышает выживаемость и эффективность репрограммирования (Watanabe et al., 2019). Через три недели после трансфекции наблюдали формирование компактных колоний, морфологически сходных с колониями эмбриональных стволовых клеток.

Общая стратегия отбора и валидации клонов ИПСК показана на рис. 1, б. В результате эписомного репрограммирования Т-лимфоцитов получено 14 первичных колоний ИПСК (PBM022E1–E14), отобранных на основе морфологических критериев. Каждая из них была выделена и культивирована как отдельная клеточная линия, что соответствует общепринятой практике при получении ИПСК (Takahashi et al., 2007). Теоретически, морфологически однородная колония может формироваться за счет близкого расположения нескольких репрограммированных клеток, что потенциально приводит к получению поликлональной линии. Хотя некоторые исследователи предполагают, что такие линии могут сохранять функциональную стабильность (Willmann et al., 2013), другие считают, что поликлональность может проявляться в виде различий в дифференцировочной способности (Yun et al., 2025) и скорости пролиферации (Mills et al., 2013), что может снижать воспроизводимость экспериментов.

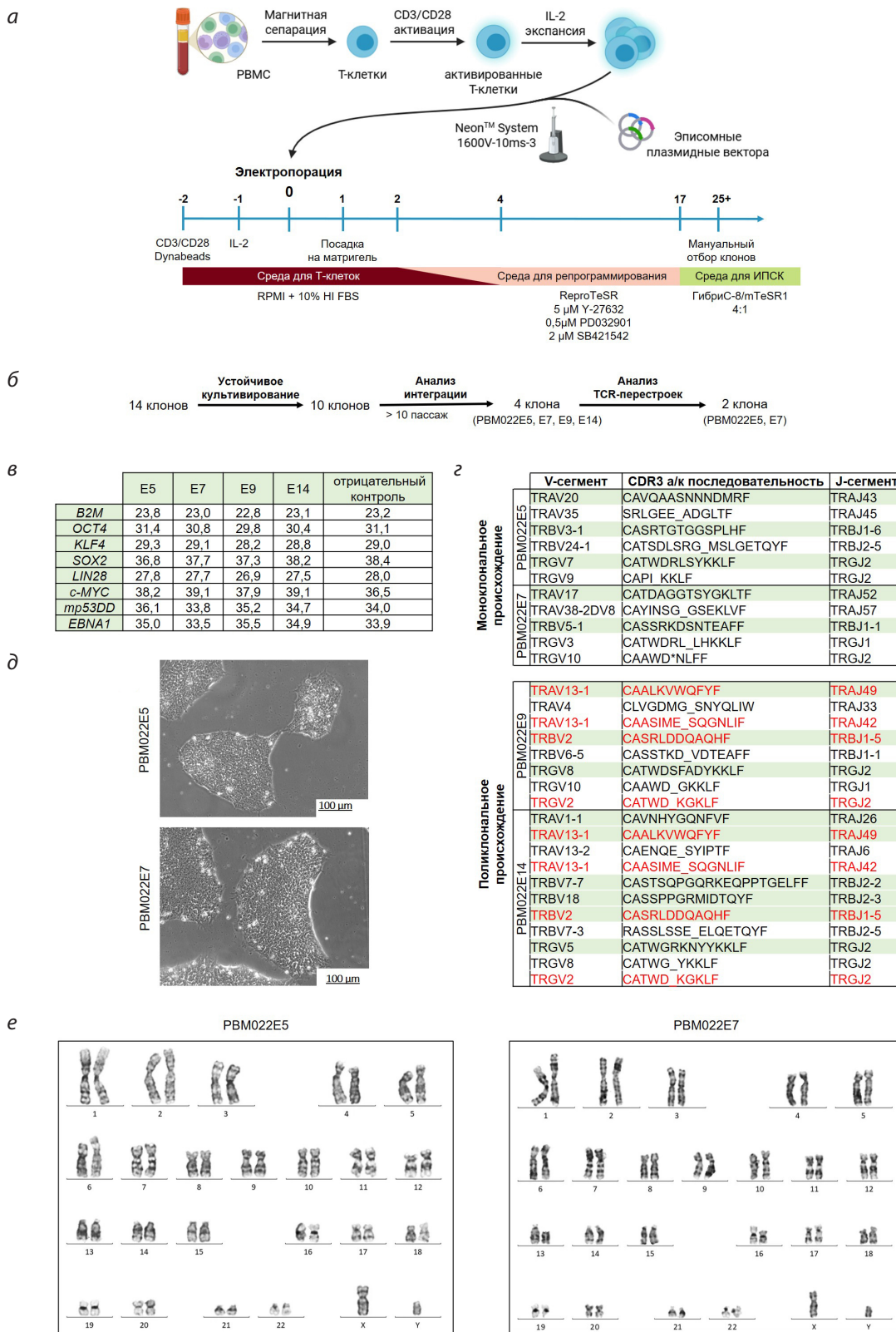
Из 14 первичных клонов ИПСК, полученных в ходе репрограммирования, 10 продемонстрировали устойчивое культивирование в течение более чем 80 дней (не менее 10 пассажей) и были отобраны для дальнейшей функциональной характеристики. Анализ интеграции трансгенов методом кПЦР показал, что четыре клона: PBM022E5, PBM022E7, PBM022E9, PBM022E14 – полностью утратили эписомные векторы (см. рис. 1, в). В качестве отрицательного контроля, не содержащего интеграций трансгенов, использовали линию ИПСК RCPMi007-A-1, полученную с помощью неинтегрирующего вектора на основе вируса Сендай (Bogomiakova et al., 2021). Ген *B2M*, кодирующий белок бета-2-микроглобулин, был использован в качестве референсного однокопийного гена, расположенного на ауtosомной хромосоме. Данные согласуются с литературными наблюдениями по элиминации эписомных плазмид в других линиях ИПСК, полученных с помощью этого метода (Григорьева и др., 2024; Подвысоцкая и др., 2025).

В отличие от других соматических клеток, зрелые Т-лимфоциты позволяют объективно подтвердить моноклональность полученных из них ИПСК путем анализа последовательностей геномных локусов, возникающих в результате V(D)J-рекомбинации в ходе созревания Т-клеток в тимусе (Alt et al., 1992). Случайная комбинация V-, D- и J-сегментов, а также инсерции и делеции нуклеотидов в местах их сшивок приводят к формированию CDR3 региона с последовательностью уникальной для каждой исходной Т-клетки-предшественника. Эта последовательность наследуется всеми потомками клетки и сохраняется после репрограммирования, позволяя оценить клональное разнообразие линий ИПСК, полученных из зрелых Т-лимфоцитов.

Так как в периферической крови здорового взрослого донора преобладают αβТ-клетки, наиболее вероятно, что полученные клоны ИПСК произошли от зрелых Т-лимфоцитов с функциональными генами α- и β-цепей TCR (Kreslavsky et al., 2008, 2010). Критерием моноклональности будет считаться наличие как минимум одной продуктивной пары V(D)J-перестроек в локусах *TRA* и *TRB*. Несколько продуктивных перестроек и/или суммарное число перестроек более двух в одном из этих локусов будут указывать на поликлональное происхождение. Перестройки в локусе *TRG* не будут влиять на интерпретацию клональности по локусам *TRA* и *TRB* при условии отсутствия перестроек в гене δ-цепи (расположен в локусе *TRAD*) и общего числа перестроек в *TRG* не более двух (Sherwood et al., 2011; Mahe et al., 2018).

Анализ V(D)J-репертуара подтвердил происхождение всех клонов от αβТ-клеток, поскольку продуктивные перестройки гена δ-цепи TCR отсутствовали. Два клона, PBM022E5 и PBM022E7, продемонстрировали типичный для моноклонального происхождения паттерн перестроек, характеризующийся наличием по одной продуктивной последовательности гена α- и β-цепи TCR (см. рис. 1, з, отмечены зеленым). Такой профиль позволяет с высокой достоверностью рассматривать эти линии как потомков отдельных родительских Т-клеток. В противоположность этому, клон PBM022E14 был классифицирован как поликлональный из-за наличия трех продуктивных перестроек β-цепи и двух – α-цепи TCR (см. рис. 1, з). Суммарно в этом клоне идентифицировано по четыре V(D)J-перестройки в локусах *TRA* и *TRB* (табл. S3). Клон PBM022E9 демонстрирует асимметричный профиль: обнаружена одна продуктивная последовательность β-цепи при наличии трех вариантов α-цепи, что может указывать на поликлональное происхождение. Анализ совпадений V(D)J-перестроек между клетками всех четырех исследуемых линий выявил наличие идентичных последовательностей α- и β-цепей TCR у клонов PBM022E9 и PBM022E14 (см. рис. 1, з и табл. S3, красный цвет), что может свидетельствовать о вероятной технической контаминации.

Таким образом, анализ геномных участков, формируемых в результате V(D)J-рекомбинации при созревании Т-лимфоцитов, представляет собой эффективный инструмент для верификации клональности ИПСК, полученных из зрелых Т-лимфоцитов. Уникальная последовательность



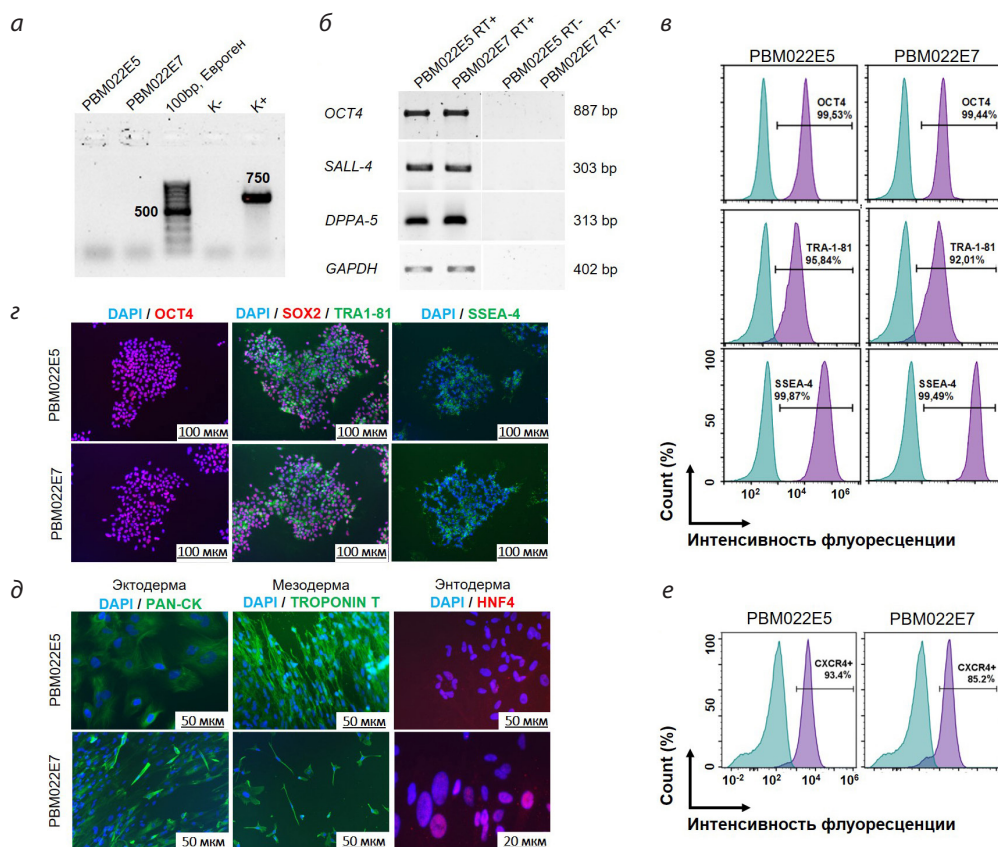
**Рис. 1.** Репрограммирование Т-клеток: *а* – схема активации и репрограммирования Т-клеток; *б* – стратегия отбора и валидации клонов ИПСК; *в* – анализ интеграции трансгенов по значению Ct: E5, E7, E9, E14 – линии PBM022E5, PBM022E7, PBM022E9, PBM022E14 соответственно, отрицательный контроль: линия ИПСК RCPMi007-A-1 (Bogomiakova et al., 2021). Сопоставимые значения Ct с отрицательным контролем свидетельствуют об отсутствии остаточных трансгенов в исследуемых клонах; *г* – анализ последовательностей V(D)J-перестроек: подчеркиванием обозначен собой рамки считывания; зеленым выделены предположительно функциональные цепи, в которых отсутствует собой рамки считывания; красным выделены варианты V(D)J-перестроек, повторяющиеся в клонах PBM022E9 и PBM022E14; *д* – морфология линий PBM022E5, PBM022E7; *е* – кариотип линий PBM022E5 и PBM022E7.

CDR3-региона, формирующаяся в результате случайной комбинации V-, D- и J-сегментов, служит надежным «генетическим баркодом» для каждой исходной клетки, обеспечивая неопровержимое доказательство моноклонального происхождения. Стабильность этого маркера, сохраняющегося неизменным после репрограммирования, позволяет использовать его для долгосрочной идентификации клонального происхождения, в том числе в дифференцированных производных. Особенно ценным этот подход становится при работе с уникальными моделями, такими как ИПСК от монозиготных близнецов, где традиционные методы генотипирования, основанные на полиморфизме ДНК, теряют информативность из-за почти полной генетической идентичности доноров (Vlasov et al., 2021). Кроме того, подход обладает высокой чувствительностью к контаминации, позволяя выявлять перекрестную загрязненность между линиями по наличию идентичных V(D)J-последовательностей.

Вместе с тем метод имеет определенные ограничения. Во-первых, он применим только к Т-клеточному происхождению и не может быть использован для ИПСК, полученных из других типов соматических клеток, например фибробластов, не обладающих аналогичными клеточно-специфическими маркерами. Во-вторых, интерпретация

результатов требует установления четких пороговых значений (в нашей работе 100 прочтений) для разграничения технических ошибок и истинной поликлональности, также необходимы специализированное оборудование для секвенирования и биоинформатические компетенции для анализа данных. Несмотря на эти ограничения, V(D)J-профайлинг представляет собой мощный инструмент для стандартизации клеточных моделей и повышения воспроизводимости исследований в области клеточной биологии.

Полученные линии ИПСК PBM022E5 (RCPCMi014-A) и PBM022E7 (RCPCMi014-B) зарегистрированы в Human Pluripotent Stem Cell Registry (hPSCreg, <https://hpscereg.eu>). Информация по данным клеточным линиям может быть найдена по следующим ссылкам: <https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-A> и <https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-B>. Обе линии продемонстрировали типичную морфологию плюрипотентных стволовых клеток (см. рис. 1, д), нормальный кариотип (46, XY) (см. рис. 1, е), а также подтвердили свою генетическую принадлежность донору по результатам STR-профилирования (данные доступны по запросу у авторов). Все линии были протестированы на отсутствие контаминации микоплазмой, что подтверждено отрицательным результатом ПЦР-анализа (рис. 2, а). Эк-



**Рис. 2.** Характеристика линий ИПСК RCPCMi014-A (PBM022E5) и RCPCMi014-B (PBM022E7): а – ПЦР-анализ на отсутствие микоплазменной инфекции; б – ОТ-ПЦР анализ экспрессии маркеров плюрипотентности; в – проточная цитометрия для маркеров плюрипотентности; г – ИЦХ окрашивание маркеров плюрипотентности: OCT4 (красный), SOX2 (красный), TRA-1-81 (зеленый), SSEA-4 (зеленый), ядро окрашено DAPI (синий); д – ИЦХ окрашивание маркеров трех зародышевых листков: эктодерма PAN-CK (зеленый), мезодерма TROPONIN T (зеленый), энтодерма HNF-4 (красный); е – проточная цитометрия раннего маркера definitivoй энтодермы CXCR4.

прессия ключевых маркеров плюрипотентности была подтверждена несколькими методами. Результаты ОТ-ПЦР показали высокий уровень экспрессии генов *OCT4*, *SALL4* и *DPPA5* (см. рис. 2, б). Данные проточной цитометрии подтвердили высокую долю положительных клеток: более 99 % экспрессировали *OCT4*, более 99 % – SSEA-4 и более 92 % – TRA-1-81 (см. рис. 2, в). Иммуноцитохимический анализ выявил экспрессию *OCT4* и *SOX2* в ядре, а также экспрессию поверхностных маркеров TRA-1-81 и SSEA-4 (см. рис. 2, г). Способность к дифференцировке в производные всех трех зародышевых листков была оценена в ходе спонтанной дифференцировки *in vitro*. Экспрессия панцитокератина подтвердила формирование производных эктодермы, тропонина Т – мезодермы, включая кардиомиоциты, а *HNf4a* – эндодермы (см. рис. 2, д).

Следующим аспектом характеристики полученных линий стала их способность к дифференцировке в дефини-

тивную эндодерму – критический этап для последующего получения β-клеток поджелудочной железы. Наши данные показывают значительную вариабельность дифференцировочного потенциала между различными линиями: лишь треть линий ИПСК демонстрируют высокую эффективность формирования дефинитивной эндодермы (рис. S1). С помощью проточной цитометрии было показано, что линии PBM022E5 и PBM022E7 имеют высокую и стабильную способность к дифференцировке в дефинитивную эндодерму, о чем свидетельствует экспрессия маркера *CXCR4* более чем у 85 % клеток по данным проточной цитометрии (см. рис. 2, е). Полученные результаты подтверждают перспективность использования этих линий для разработки и оптимизации протоколов направленной дифференцировки в инсулин-продуцирующие клетки. Паспорт клеточных линий RCPCMi014-A (PBM022E5) и RCPCMi014-B (PBM022E7) см. далее.

#### Паспорт клеточных линий RCPCMi014-A (PBM022E5) и RCPCMi014-B (PBM022E7)

Уникальный идентификатор	RCPCMi014-A, RCPCMi014-B
Альтернативное название линии	PBM022E5, PBM022E7
Учреждение	Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия
Одобрение этического комитета	Исследование одобрено этической комиссией Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина, протокол № 1 от 01.06.2021
Тип клеток	ИПСК
Вид организма	Человек
Дополнительная информация о происхождении клеточной линии	Возраст: 35 Пол: М Этническая принадлежность: европеоидная раса
Исходный тип клеток	Т-клетки
Дата забора биоматериала	26.03.2024
Способ репрограммирования	Неинтеграционные эписомные векторы
Репрограммирующие факторы	<i>OCT4</i> , <i>SOX2</i> , <i>KLF4</i> , <i>LIN28</i> , <i>L-MYC</i> , <i>EBNA1</i> и <i>mp53DD</i>
Клональность	Клональные
Заболевание	Нет
Ген/локус	–
Морфология	Монослойные колонии, подобные плюрипотентным стволовым клеткам человека
Плюрипотентность	Подтверждена в тестах на формирование эмбриоидных тел, спонтанную дифференцировку в производные трех зародышевых листков, а также экспрессию специфических маркеров
Кариотип	46, XY
Проверка контаминации	Микоплазма не обнаружена
Область применения	Референсная линия ИПСК здорового донора
Способ культивирования	На подложке из Матригеля
Среда культивирования	ГибриС-8 (ПанЭко):mTeSR 1 (STEMCELL) = 4:1, 50 мкг/мл пенициллин-стрептомицин или 10 мкг/мл гентамицин
Температура, °C	37
Концентрация CO <sub>2</sub> , %	5
Концентрация O <sub>2</sub> , %	20
Способ пересева	Энзиматический, трипсин-ЭДТА (Gibco или ПанЭко)
Кратность пересева	1:4–1:6
Криоконсервация	90 % FBS, 10 % ДМСО, 5 мкМ ROCK inhibitor Y-27632 (Stemcell Technologies)
Условия хранения	Жидкий азот
Учетная запись в реестре	<a href="https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-A">https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-A</a> <a href="https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-B">https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi014-B</a>
Дата паспортизации/депонирования	21.08.2024

## Заключение

В ходе настоящей работы получены и охарактеризованы моноклональные линии ИПСК, репрограммированные из Т-лимфоцитов здорового донора. Анализ V(D)J-перестроек генов TCR обеспечил достоверную верификацию моноклональности линий, что критически важно для моделей, требующих высокой генетической однородности. Показано, что полученные линии RCPMi014-A (PBM022E5) и RCPMi014-B (PBM022E7) соответствуют всем критериям качества для ИПСК и демонстрируют высокую эффективность дифференцировки в definitive эндодерму, что делает их перспективными для генерации  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Полученные линии могут служить надежными эталонными моделями как для фундаментальных исследований механизмов плюрипотентности и дифференцировки, так и для прикладных задач, включая создание изогенных пар при моделировании редких и других заболеваний, а также отработку методологических подходов в регенеративной медицине.

## Список литературы / References

Григорьева Е.В., Малахова А.А., Яркова Е.С., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Надточий Ю.А., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Закиан С.М. Создание и характеристика двух линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ICGi052-A и ICGi052-B) от пациента с лобно-височной деменцией с паркинсонизмом-17, ассоциированной с патологическим вариантом с.2013T>G в гене *MAPT*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/VJGB-24-76 [Grigor'eva E.V., Malakhova A.A., Yarkova E.S., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Nadtochy J.A., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Generation and characterization of two induced pluripotent stem cell lines (ICGi052-A and ICGi052-B) from a patient with frontotemporal dementia with parkinsonism-17 associated with the pathological variant c.2013T>G in the *MAPT* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Gen Breed*. 2024;28(7):679-687. doi 10.18699/VJGB-24-76]

Подвысоцкая В.С., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Минина Ю.М., Вяткин Ю.В., Хабарова Е.А., Рзаев Дж.А., Медведев С.П., Коваленко Л.В., Закиан С.М. Создание и характеристика семи линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от двух пациентов с болезнью Паркинсона, несущих вариант с.1087G>T гена *LGR4*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/VJGB-25-03 [Podvysotskaya V.S., Grigor'eva E. V., Malakhova A.A., Minina J.M., Vyatkin Y. V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Medvedev S.P., Kovalenko L. V., Zakian S.M. Generation and characterisation of seven induced pluripotent stem cell lines from two patients with Parkinson's disease carrying the pathological variant c.1087G>T of the *LGR4* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Gen Breed*. 2025;29(1):15-25. doi 10.18699/VJGB-25-03]

Федоренко А.В., Хомякова Е.А., Сурдина А.В., Секретова Е.К., Лиманская Т.В., Беликова Л.Д., Воловиков Е.А., ... Федотова Д.А., Зеркаленкова Е.А., Лагарькова М.А., Лебедев И.Н., Богомазова А.Н. Создание клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для изучения функций гена *UBE2A*. *Гены и Клетки*. 2024;19(2):297-313. doi 10.17816/GC623799 [Fedorenko A.V., Khomyakova E.A., Surdina A.V., Sekretova E.K., Limanskaya T.V., Belikova L.D., Volovikov E.A., ... Fedotova D.A., Zerkalenkova E.A., Lagarkova M.A., Lebedev I.N., Bogomazova A.N. Design of iPSC-based cell model to study the functions of the *UBE2A* gene. *Genes and Cells*. 2024;19(2):297-313. doi 10.17816/GC623799 (in Russian)]

Хомякова Е.А., Федоренко А.В., Сурдина А.В., Воловиков Е.А., Беликова Л.Д., Зеркаленкова Е.А., Лагарькова М.А., Богомазова А.Н. Создание линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток RCPMi009-A-1 с нокаутом гена *UBE2A* с помощью технологии редактирования генома CRISPR/Cas9. *Онтогенез*. 2023;54(6):405-414. doi 10.31857/S0475145023060046 [Khomyakova E.A., Fedorenko A.V., Surdina A.V., Volovikov E.A., Belikova L.D., Zerkalenkova E.A., Lagarkova M.A., Bogomazova A.N. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi009-A-1) with knockout of the *UBE2A* gene by using CRISPR/Cas9 genome editing. *Russ J Dev Biol*. 2023;54(6):365-373. doi 10.1134/S1062360423060048]

Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. VDJ recombination. *Immunol Today*. 1992;13(8):306-314. doi 10.1016/0167-5699(92)90043-7

Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Ereemeev A.V., Shuvalova L.D., Bobrovsky P.A., Zerkalenkova E.A., Lebedeva O.S., Lagarkova M.A. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Stem Cell Res*. 2021;55:102451. doi 10.1016/J.SCR.2021.102451

Cerneckis J., Cai H., Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):112. doi 10.1038/S41392-024-01809-0

Goliusova D.V., Lebedeva O.S., Sharikova M.Y., Kopylova I.V., Teryakova M.V., Lavrenteva K.A., Zerkalenkova E.A., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Derivation of RCPMi011-A induced pluripotent stem cell line from fibroblasts of a patient with restrictive cardiomyopathy caused by c.7416\_7418delGAA mutation in the *FLNC* gene. *Russ J Dev Biol*. 2024;55(6):347-355. doi 10.1134/S1062360425700055

Goliusova D.V., Bogomolova A.P., Davidenko A.V., Lavrenteva K.A., Sharikova M.Y., Zerkalenkova E.A., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Katrukha I.A., Lebedeva O.S. Metabolic culture medium enhances maturation of human iPSC-derived cardiomyocytes via cardiac troponin I isoform induction. *Int J Mol Sci*. 2025;26(15):7248. doi 10.3390/IJMS26157248/S1

Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., Pavlova S.V., Sorogina D.A., Malakhova A.A., Malankhanov T.B., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Medvedev S.P., Pchelina S.N., Zakian S.M. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S *GBA* variant carriers with and without Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5). doi 10.3390/IJMS24054437

Harbut E., Makris Y., Pertsemliadis A., Bleris L. The history, landscape, and outlook of human cell line authentication and security. *SLAS Discov*. 2024;29(8):100194. doi 10.1016/J.SLASD.2024.100194

Kishino Y., Seki T., Fujita J., Yuasa S., Tohyama S., Kunitomi A., Tabei R., Nakajima K., Okada M., Hirano A., Kanazawa H., Fukuda K. Derivation of transgene-free human induced pluripotent stem cells from human peripheral T cells in defined culture conditions. *PLoS One*. 2014;9(5):e97397. doi 10.1371/journal.pone.0097397

Kreslavsky T., Garbe A., Krueger A., von Boehmer H. T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. *J Exp Med*. 2008;205(5):1173-1186. doi 10.1084/jem.20072425

Kreslavsky T., Gleimer M., von Boehmer H. Alphabeta versus gammadelta lineage choice at the first TCR-controlled checkpoint. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):185-192. doi 10.1016/j.coi.2009.12.006

Mahe E., Pugh T., Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol*. 2018;71(3):195-200. doi 10.1136/jclinpath-2017-204761

Martin A.R., Williams E., Foulger R.E., Leigh S., Daugherty L.C., Niblock O., Leong I.U.S., ... Kasperaviciute D., Smedley D., Caulfield M., Rendon A., McDonagh E.M. PanelApp crowdsources expert knowledge to establish consensus diagnostic gene panels. *Nat Genet*. 2019;51(11):1560-1565. doi 10.1038/S41588-019-0528-2

Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., Komkov D., Shepelev M., Golubev D., Siniavin A., Vzorov A., Filatov A., Mazu-

- rov D. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41. *mBio*. 2022; 13(1):e0358921. doi 10.1128/mbio.03589-21
- Mills J.A., Wang K., Paluru P., Ying L., Lu L., Galvão A.M., Xu D., ... Mostoslavsky G., Kotton D.N., French D.L., Weiss M.J., Gadue P. Clonal genetic and hematopoietic heterogeneity among human-induced pluripotent stem cell lines. *Blood*. 2013;122(12):2047-2051. doi 10.1182/blood-2013-02-484444
- Nishimura T., Kaneko S., Kawana-Tachikawa A., Tajima Y., Goto H., Zhu D., Nakayama-Hosoya K., ... Iwamoto A., Koseki H., Nakanishi M., Eto K., Nakauchi H. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):114-126. doi 10.1016/j.stem.2012.11.002
- Okita K., Yamakawa T., Matsumura Y., Sato Y., Amano N., Watanabe A., Goshima N., Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*. 2013;31(3):458-466. doi 10.1002/stem.1293
- Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Gen Med*. 2015;17(5):405-424. doi 10.1038/gim.2015.30
- Seki T., Yuasa S., Oda M., Egashira T., Yae K., Kusumoto D., Nakata H., ... Okada Y., Seimiya H., Fusaki N., Hasegawa M., Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating t cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):11-14. doi 10.1016/j.stem.2010.06.003
- Sherwood A., Desmarais C., Livingston R., Andriesen J., Haussler M., Carlson C., Robins H. Deep sequencing of the human TCR $\gamma$  and TCR $\beta$  repertoires suggests that TCR $\beta$  rearranges after  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cell commitment. *Sci Transl Med*. 2011;3(90):90ra61. doi 10.1126/scitranslmed.3002536
- Summers R.A., Fagiani F., Rowitch D.H., Absinta M., Reich D.S. Novel human iPSC models of neuroinflammation in neurodegenerative disease and regenerative medicine. *Trends Immunol*. 2024; 45(10):799-813. doi 10.1016/j.it.2024.08.004
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-172. doi 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Vlasov I.N., Alieva A.K., Novosadova E.V., Arsenyeva E.L., Rosinskaya A.V., Partevian S.A., Grivennikov I.A., Shadrina M.I. Transcriptome analysis of induced pluripotent stem cells and neuronal progenitor cells, derived from discordant monozygotic twins with Parkinson's disease. *Cells*. 2021;10(12):3478. doi 10.3390/cells10123478
- Watanabe T., Yamazaki S., Yoneda N., Shinohara H., Tomioka I., Higuchi Y., Yagoto M., Ema M., Suemizu H., Kawai K., Sasaki E. Highly efficient induction of primate iPSC cells by combining RNA transfection and chemical compounds. *Genes Cells*. 2019;24(7):473-484. doi 10.1111/gtc.12702
- Willmann C.A., Hemeda H., Pieper L.A., Lenz M., Qin J., Jousen S., Sontag S., Wanek P., Denecke B., Schüler H.M., Zenke M., Wagner W. To clone or not to clone? Induced pluripotent stem cells can be generated in bulk culture. *PLoS One*. 2013;8(5):e65324. doi 10.1371/journal.pone.0065324
- Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy – promise and challenges. *Cell Stem Cell*. 2020;27(4):523-531. doi 10.1016/j.stem.2020.09.014
- Yun J., So J., Jeong S., Jang J., Han S., Jeon J., Lee K., Jang H.R., Lee J. Transcriptome and epigenome dynamics of the clonal heterogeneity of human induced pluripotent stem cells for cardiac differentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2025;82(1):2. doi 10.1007/S00018-024-05493-9

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 03.10.2025. После доработки 26.11.2025. Принята к публикации 27.11.2025.