

РАННИЕ МАРКЕРЫ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Шевелева О.Н.¹, Ненашева Т.А.¹, Лядова И.В.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Генерация иммунокомпетентных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток является ценной моделью для изучения механизмов регуляции гемопоэза и перспективным подходом к разработке новых методов иммунотерапии различных заболеваний, включая наследственные, онкологические и инфекционные. К настоящему времени показана возможность получения из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека различных клеток иммунной системы, в том числе макрофагов, нейтрофилов, естественных киллеров и Т-лимфоцитов. Однако предложенные протоколы носят в основном экспериментальный характер и для дальнейшего применения требуют оптимизации, стандартизации и масштабирования. Решение этих задач, в свою очередь, требует наличия методов ранней оценки эффективности проводимой дифференцировки. В настоящей работе оценивали возможность использования проточной цитометрии для мониторинга эффективности ранних этапов гемопоэтической дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Гемопоэтическую и миелоидную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека проводили с использованием двух протоколов, предложенных ранее для генерации макрофагов из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Используемые протоколы различались по условиям проведения ранних и поздних стадий дифференцировки. Ранние этапы дифференцировки различались по способу индукции образования мезодермальных клеток и гемогенного эндотелия: дифференцировка в условиях 2D с добавлением экзогенных факторов, стимулирующих мезодермальное направление дифференцировки («фактор-зависимый» протокол) или в условиях 3D без добавления экзогенных факторов («спонтанный» протокол). На более поздних стадиях протоколы различались по набору экзогенных факторов, используемых для индукции гемопоэтической и миелоидной спецификации (SCF, FGF2, IL-6, IL-3 и M-CSF или только IL-3 и M-CSF).

Адрес для переписки:

Лядова Ирина Владимировна
ФГБУН «Институт биологии развития имени
Н.К. Кольцова Российской академии наук»
119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, 26.
Тел.: 8 (499) 135-87-80.
E-mail: ivlyadova@mail.ru

Address for correspondence:

Irina V. Lyadova
Koltzov Institute of Developmental Biology,
Russian Academy of Sciences
26 Vavilov St
Moscow
119334 Russian Federation
Phone: +7 (499) 135-87-80.
E-mail: ivlyadova@mail.ru

Образец цитирования:

О.Н. Шевелева, Т.А. Ненашева, И.В. Лядова «Ранние маркеры гемопоэтической дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 883-890. doi: 10.15789/1563-0625-ЕМО-16759

© Шевелева О.Н. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.N. Sheveleva, T.A. Nenasheva, I.V. Lyadova “Early markers of induced pluripotent stem cell hematopoietic development”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 883-890. doi: 10.15789/1563-0625-ЕМО-16759

© Sheveleva O.N. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ЕМО-16759

В процессе дифференцировки с использованием обоих протоколов проводили анализ экспрессии маркеров мезодермы, гемогенного эндотелия и гемопоэтических клеток (CD309, CD34, CD31, CD43 и CD45). На начальных стадиях дифференцировки основным фенотипическим изменением было появление экспрессии на клетках рецептора к фактору роста эндотелия сосудов CD309, экспрессии сиалофорина CD43, а также антигена CD34. При использовании фактор-зависимого 2D-протокола эти изменения фиксировались раньше и были более выраженными, чем при использовании протокола, основанного на спонтанной дифференцировке клеток в условиях 3D. Полученные результаты позволяют заключить, что определение экспрессии CD309 и/или CD43 может быть использовано для ранней предикции успешности дифференцировки и ПСК в гемопоэтическом направлении.

Ключевые слова: дифференцировка иммунных клеток *in vitro*, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, мезодерма, гемогенный эндотелий, проточная цитометрия, CD309, CD43

EARLY MARKERS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL HEMATOPOIETIC DEVELOPMENT

Sheveleva O.N.^a, Nenasheva T.A.^a, Lyadova I.V.^{a, b}

^a Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. The generation of immune cell populations from induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a valuable model to study mechanisms that control hematopoietic development; it also is a promising approach to develop immunotherapeutic strategies to treat various diseases, including hereditary, oncological and infectious ones. To date, it has been demonstrated that iPSCs can differentiate into different immune cells, including macrophages, neutrophils, natural killer cells and T cells. However, the protocols suggested so far are experimental, and they require optimization, standardization and scaling. Solution to these tasks requires methods allowing to predict the efficacy of ongoing differentiation at early differentiation stages. Here, we evaluated whether iPSC hematopoietic/myeloid differentiation can be monitored by means of flow cytometry. Human iPSCs were differentiated into hematopoietic/myeloid cells using two protocols previously suggested for the generation of macrophages from iPSCs. The protocols differed by methods used to induce early and late stages of cell differentiation. At early differentiation stages, the protocols differed by approaches used to induce the generation of mesoderm and hemogenic endothelium, i.e., 2D differentiation in the presence of exogenous factors known to promote mesoderm and hemogenic endothelium development (“factor-dependent” protocol) or 3D differentiation in the absence of exogenous cytokines and growth factors (“spontaneous” protocol). At late differentiation stages, the protocols differed by factors added to the cultures to promote hematopoietic/myeloid specification (i.e., SCF, FGF2, IL-6, IL-3 and M-CSF or only IL-3 and M-CSF). At different stages of differentiation, the expressions of antigens known to be expressed by mesoderm, hemogenic endothelium and hematopoietic cells (i.e., CD309, CD34, CD31, CD43 and CD45) were evaluated. At early differentiation stages, the main phenotypic changes observed in cell cultures were an upregulation of the expression of CD309 (a receptor for vascular endothelial growth factor), the appearance of the expression of sialophorin CD43 and the expression of CD34 antigen. In cells cultured in 2D factor-dependent conditions, these changes appeared earlier and were more pronounced as compared with cells cultured in 3D “spontaneous” conditions. The results suggest that CD309 and/or CD43 are valuable markers for an early prediction of the effectiveness of iPSC differentiation into hematopoietic/myeloid progeny.

Keywords: immune cell differentiation *in vitro*, induced pluripotent stem cells, mesoderm, hemogenic endothelium, flow cytometry, CD309, CD43

Работа поддержана Минобрнауки России № ГЗ 0088-2024-0013.

Введение

Иммунная система играет ключевую роль в поддержании гомеостаза организма, распознавании и элиминации чужеродных антигенов. Нарушение нормального функционирования различных популяций иммунных клеток лежит в основе многих заболеваний, в том числе наследственных, онкологических, инфекционных. Перспективным подходом к коррекции иммунологических нарушений является клеточная иммунотерапия [3, 13]. При этом терапия, основанная на использовании аутологичных или аллогенных клеток (активированных, поляризованных или генетически модифицированных в желаемом направлении), ограничена доступностью, количеством и качеством клеток, которые могут быть получены от доноров и, кроме того, является дорогой и трудоемкой. В связи с этим в последнее время все большее внимание привлекают методы получения иммунных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (иПСК). К настоящему времени опубликованы экспериментальные протоколы получения из иПСК естественных киллеров, Т-лимфоцитов, дендритных клеток и макрофагов [2, 6, 7, 9, 12]. Используемые методы основаны на стимуляции дифференцировки иПСК в мезодермальном направлении, индукции образования из мезодермы клеток гемогенного эндотелия с последующей его дифференцировкой в гемопоэтическом направлении и специализации в определенный тип иммунных клеток за счет культивирования в присутствии факторов, ответственных за образование различных линий гемопоэтических и иммунных клеток. При этом имеющиеся методы носят, в основном, экспериментальный характер; их дальнейшее применение требует оптимизации, стандартизации, масштабирования, повышения эффективности «выхода» иммунных клеточных популяций и воспроизводимости результатов. Решение этих задач в значительной степени зависит от наличия методов ранней оценки эффективности проводимой дифференцировки. В настоящей работе оценивали возможность использования проточной цитометрии для мониторинга ранних этапов гемопоэтической дифференцировки иПСК и ранней предикции эффективности проводимой дифференцировки.

Материалы и методы

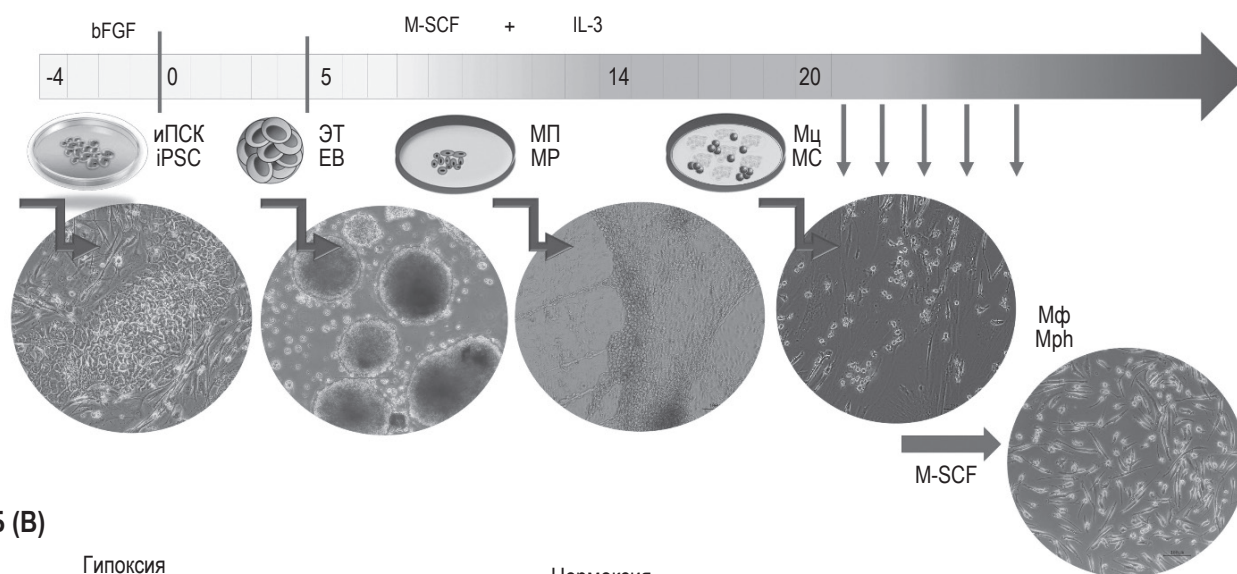
В работе использовали линии иПСК IMA и K7-4Lf, полученные, соответственно, из фибро-

бластов и мононуклеаров крови человека и любезно предоставленные нам для исследований Е.В. Григорьевой (Институт цитологии и Генетики СО РАН [8]). Линии иПСК пассировали, как это было описано ранее [4]. Для анализа траекторий гемопоэтической дифференцировки и поиска маркеров-предикторов эффективности дифференцировки использовали отработанную ранее в лаборатории модель дифференцировки иПСК в миелоидном (моноцитарно-макрофагальном) направлении [4, 10].

Гемопоэтическую дифференцировку иПСК проводили с использованием двух подходов (рис. 1). Первый подход (фактор-зависимая индукция, рис. 1А) заключался в культивировании иПСК на матригеле (Corning, Somerville, США) в условиях 2D. При использовании этого подхода индукцию всех стадий дифференцировки, включая начальную стадию образования мезодермы, обеспечивали, добавляя в культуру экзогенные факторы, стимулирующие последовательное образование мезодермы, гемогенного эндотелия, гемопоэтических предшественников и миелоидных клеток. При этом использовали протокол, предложенный ранее Takata и соавт. [11] в нашей модификации [4]. Кратко, клетки культивировали в среде StemPro™-34 с добавлением: в дни с -6 до 0 – BMP4, VEGFA, FGF2 (Biolegend, San Diego, CA, США) и CHIR99021 (Sigma, Burlington, США); в дни с 0 по +6 – VEGFA, FGF2, SCF, DKK, IL-6 и IL-3 (BioLegend, США); в дни с +6 по +10 – FGF2, SCF, IL-6 и IL-3. С 10-го дня клетки переводили в среду RPMI-1640 и культивировали в ней в присутствии интерлейкина-3 (IL-3, 25 нг/мл) и макрофагального колоний-стимулирующего фактора (M-CSF, 50-100 нг/мл; BioLegend (США); подробное описание протокола в статье [4]). За день 0 условно принимали день начала индукции гемопоэтической дифференцировки.

Второй подход (спонтанная индукция, рис. 1Б) основан на спонтанном (самопроизвольном) образовании из иПСК клеток мезодермального типа. При использовании этого подхода культуры иПСК снимали с пластика с использованием коллагеназы (collagenase IV, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, США), полученные при этом агрегаты иПСК культивировали в течение 4 дней в низкоадгезионных условиях в среде DMEM-F12, дополненной 15% заменителя сыворотки (KnockOut™ Serum Replacement), 2 мкМ глутамакса, 1%-ным раствором пеницилина/стрептомицина (все – Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, США), 1%-ным раствором незаменимых аминокислот (STEMCELL, Vancouver, BC, Канада)

А (А)



Б (Б)

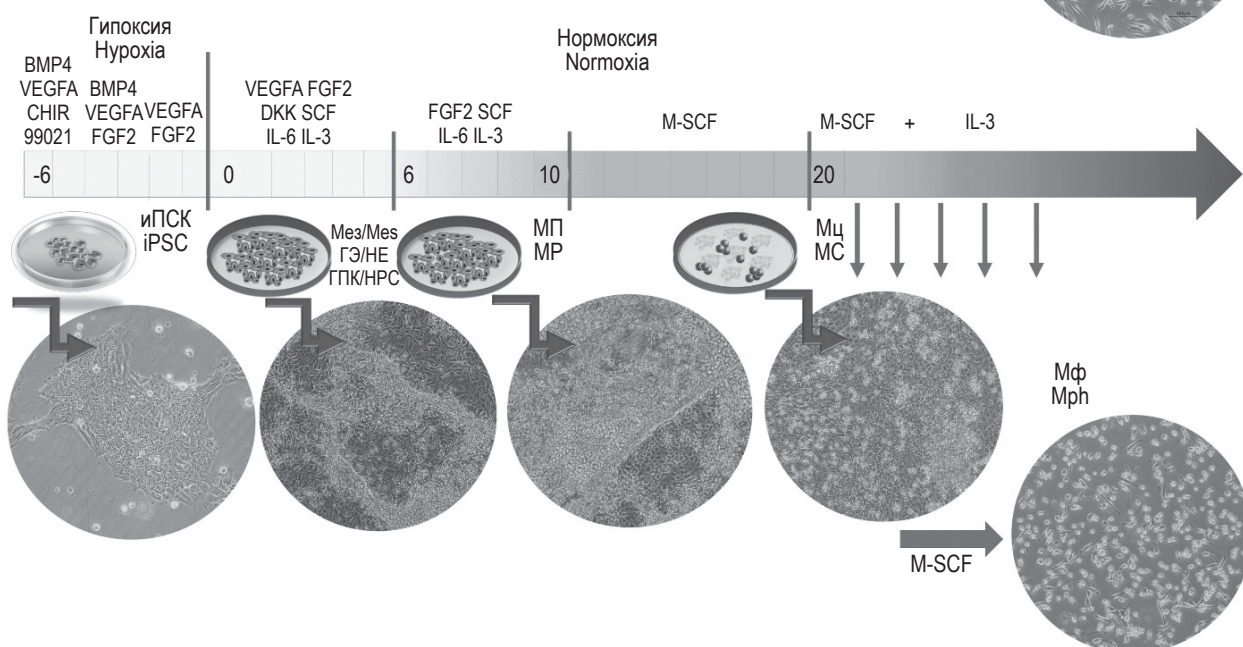


Рисунок 1. Схема дифференцировки iPSC в миелоидном направлении с использованием «фактор-зависимого» (А) и «спонтанного» (Б) протоколов

Примечание. iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, Мез – мезодерма, ГЭ – гемогенный эндотелий, ГПК – гемопоэтические прогениторные клетки, МП – миелоидные предшественники, Мц – моноцитоподобные клетки, Мф – макрофаги, ЭТ – эмбрионные тельца.

Figure 1. The scheme of iPSC-derived myeloid cell differentiation using “factor-dependent” (A) and “spontaneous” (B) protocols
Note. iPSC, induced pluripotent stem cells; Mes, mesoderm; HE, hemogenic endothelium; HPC, hematopoietic progenitor cells; MP, myeloid progenitors; MC, monocyte-like cells; Mph, macrophages, EB, embryoid bodies.

и 0.055 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma, St. Louis, MO, США). Известно, что низкоадгезионные условия способствуют агрегации клеток и образованию эмбрионных тел (ЭТ) – 3D-структур, способных к самопроизвольной дифференци-

ровке в клетки всех трех зародышевых листков, включая мезодерму [6, 14]. На 4-й день культивирования полученные ЭТ собирали, перевели в адгезионные условия и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей IL-3 (25 нг/мл) и

M-CSF (50-100 нг/мл; среда была дополнена 10% FCS (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мкМ глутамакса, 1%-ным раствором пеницилина/стрептомицина, 1%-ным раствором незаменимых аминокислот и 0,055 мМ β-меркаптоэтанола).

Для анализа траекторий клеточной дифференцировки в разные сроки после начала культивирования адгезивные (дифференцирующиеся) клетки собирали и анализировали экспрессию на них маркеров мезодермы, гемогенного эндотелия и ранних гемопоэтических клеток. Список использованных антител включал антитела: анти-CD309-BV421, анти-CD34-APC, анти-CD31-BV510, анти-CD43-PE и CD45-FITC (BioLegend, США). Эффективность проведенной дифференцировки оценивали, определяя появление в культурах на 3-4 неделях культивирования плавающих клеток, имеющих макрофагоподобную морфологию и экспрессирующих фенотип CD14⁺ (антитела анти-CD14-PerCP.CyTM5.5, BioLegend, США).

Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили на проточном цитометре Cytotflex-S (Beckman Coulter, Brea, CA, США); результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (TreeStar BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, США).

Результаты и обсуждение

иПСК линий K7 и iMA наращивали и индуцировали их гемопоэтическую дифференцировку с использованием «фактор-зависимого» и «спонтанного» протоколов (рис. 1). В разные сроки после начала дифференцировки адгезивные клетки собирали, обрабатывали антителами и анализировали экспрессию CD309 (KDR, рецептор к фактору роста эндотелия сосудов, VEGF); CD34 (молекула межклеточной адгезии, участвующая в ранних стадиях гемопоэза); CD31 (молекула адгезии эндотелиальных клеток, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM 1); CD43 (сиалофорин, экспрессированный на поверхности различных иммунных клеток, экспрессия характерна для гемопоэтически-коммитированных клеток-предшественников) и CD45 (тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа, общий лейкоцитарный маркер). Поскольку стимуляция гемопоэтической спецификации в фактор-зависимом и спонтанном протоколе начинается в разные дни после начала дифференцировки (на 6-й и 4-й дни соответственно), за день 0 принимали день внесения в культуры факторов, стимулирующих гемопоэтическую спецификацию. Соответственно, дни начала дифференцировки

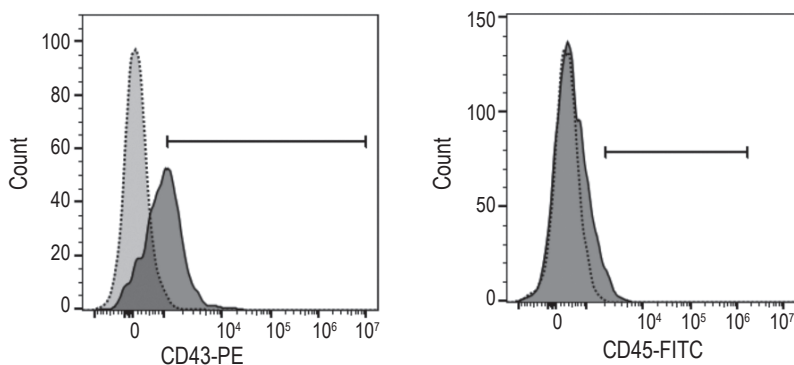
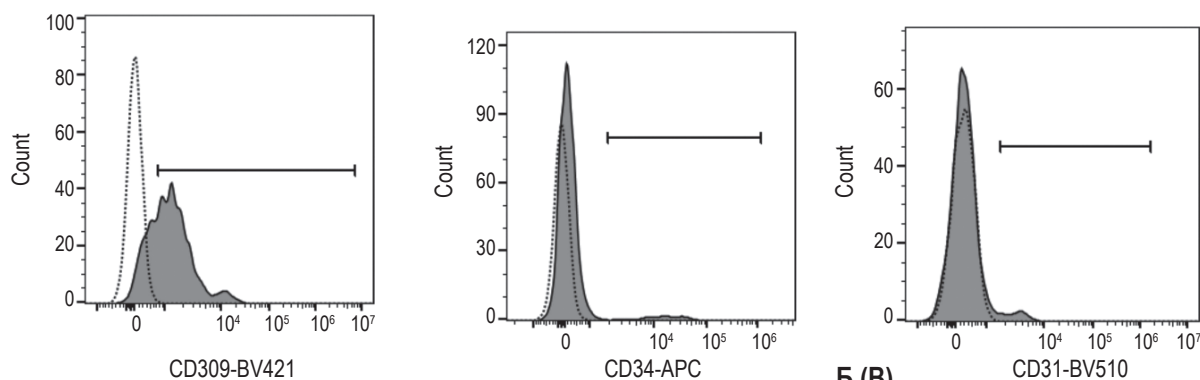
обозначали как день -6 (фактор-зависимый протокол) и день -4 (протокол спонтанной дифференцировки (рис. 1).

При дифференцировке иПСК с использованием фактор-зависимого протокола первые фенотипические изменения были отмечены уже в день 0. Основные изменения заключались в появлении на клетках экспрессии CD309, CD34 и CD43 (рис. 2А). Экспрессия CD309 характерна для клеток мезодермы (фенотип CD309⁺CD34⁻CD31⁻) и гемогенного эндотелия (фенотип CD309⁺CD34⁺CD31⁺) [1, 5]. Основная часть клеток CD309⁺, детектируемых на ранних стадиях дифференцировки, имели фенотип CD34⁻; при дальнейшей дифференцировке увеличивалась доля клеток CD309⁺, экспрессирующих CD34 (рис 2Б, 3). Другим ранним маркером дифференцировки был антиген CD43. При использовании фактор-зависимого протокола дифференцировки появление клеток CD43⁺ отмечалось уже в день 0. Экспрессия CD45, общего лейкоцитарного маркера, регистрировалась менее чем на 1-2% дифференцирующихся клеток на всех стадиях дифференцировки, включая поздние. Однако на поздних стадиях дифференцировки CD45⁺ клетки появлялись среди «плавающей», не адгезионной популяции, в которой клетки CD45⁺ составляли более 80-90% (рис. 2В).

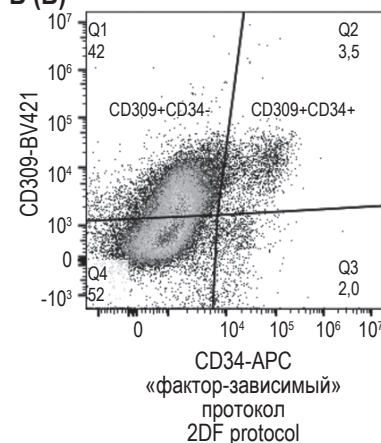
При дифференцировке иПСК с использованием «спонтанного» протокола в целом отмечались сходные изменения фенотипа, однако они наступали позже, а доля образующихся клеток-предшественников (CD309⁺, CD34⁺, CD43⁺) была ниже, чем при использовании «фактор-зависимого» протокола (рис. 3). Полученные результаты согласуются с результатами, полученными нами ранее: сравнительный динамический анализ транскриптома дифференцирующихся клеток показал, что при использовании фактор-зависимого протокола характерные для дифференцировки изменения в экспрессии генов, ассоциированных с гемопоэтической и миелоидной спецификацией, наступают раньше и более синхронно, чем при применении спонтанного протокола [4].

Анализ образования в культурах моноцитоподобных CD14⁺ клеток показал, что они появлялись как при использовании фактор-зависимого, так и при использовании спонтанного протоколов дифференцировки (рис. 2Г). Однако некоторые из дифференцировок с использованием спонтанного протокола не привели к генерации моноцитоподобных клеток и макрофагов, в то время как все дифференцировки

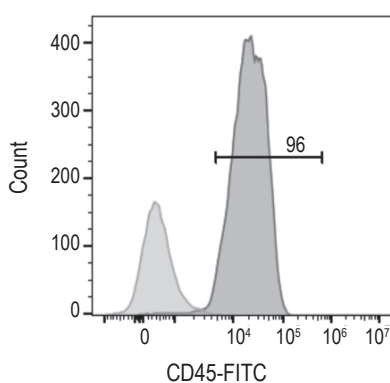
A (A)



Б (B)



В (C)



Г (D)

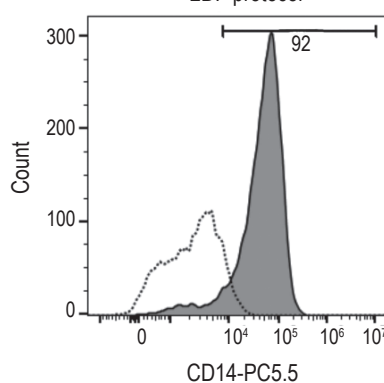
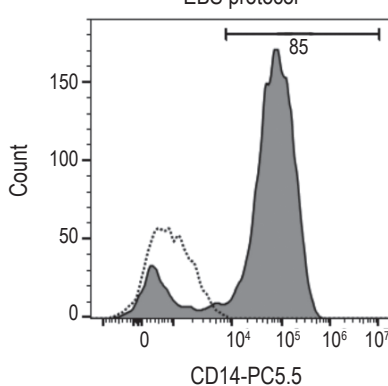


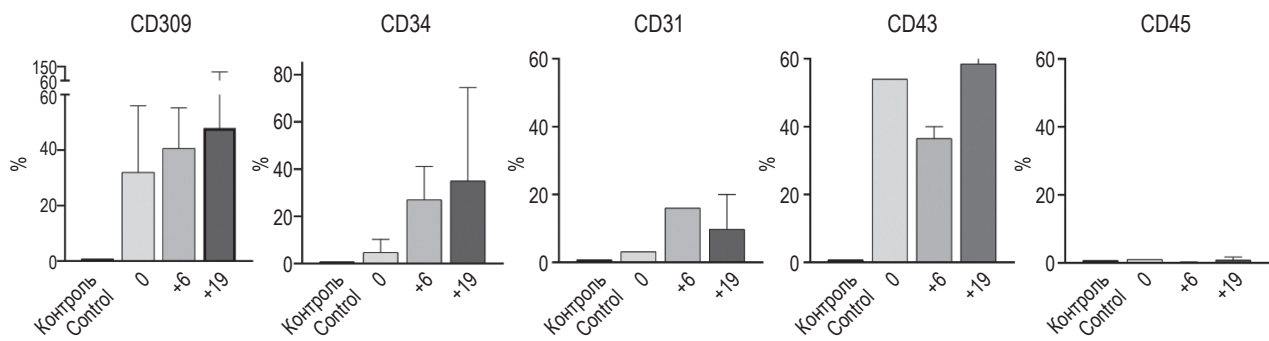
Рисунок 2. Дифференцировка иПСК в гемопоэтические/миелоидные клетки сопровождается появлением экспрессии антигенов CD309 и CD43

Примечание. иПСК линий iMA и K7-4LF дифференцировали в моноцитоподобные клетки с использованием протоколов фактор-зависимой и спонтанной дифференцировки. Экспрессию антигенов CD309, CD34, CD31, CD43 и CD45 оценивали в дни дифференцировки 0, +6, +10/11 и +19. А – пример цитометрического анализа дифференцирующихся клеток на ранних стадиях дифференцировки (иПСК линии iMA, день дифференцировки 0, фактор-зависимый протокол). Б – характер ко-экспрессии антигенов CD309 и CD34 в процессе гемопоэтической индукции (репрезентативные данные; иПСК линии K7-4Lf, день +6, фактор-зависимый протокол). В, Г – экспрессия CD45(В) и CD14 (Г) на плавающих клетках, образующихся в культурах на поздних стадиях дифференцировки (репрезентативные данные; иПСК линии iMA, день +19, фактор-зависимый протокол)

Figure 2. iPSC differentiation into hematopoietic/myeloid direction is accompanied by an increase in the expression of CD309 and CD43 antigens

Note. iPSC lines iMA and K7-4Lf were differentiated into monocyte-like cells using “factor-dependent” and “spontaneous” protocols. The expression of CD309, CD34, CD31, CD43 and CD45 was evaluated at differentiation days 0, +6, +10/11 and +19. A, representative results showing cell phenotype at early differentiation stage (iPSC line iMA, differentiation day 0, factor-dependent protocol). B, the pattern of CD309 and CD34 co-expression (representative results; iPSC line K7-4Lf, factor-dependent protocol, differentiation day +6). C, D, the expression of CD45 (C) and CD14 (D) by floating cells accumulating in the cultures at late differentiation stages (representative results obtained at day +19; iPSC line iMA, factor-dependent protocol).

A (A)



Б (B)

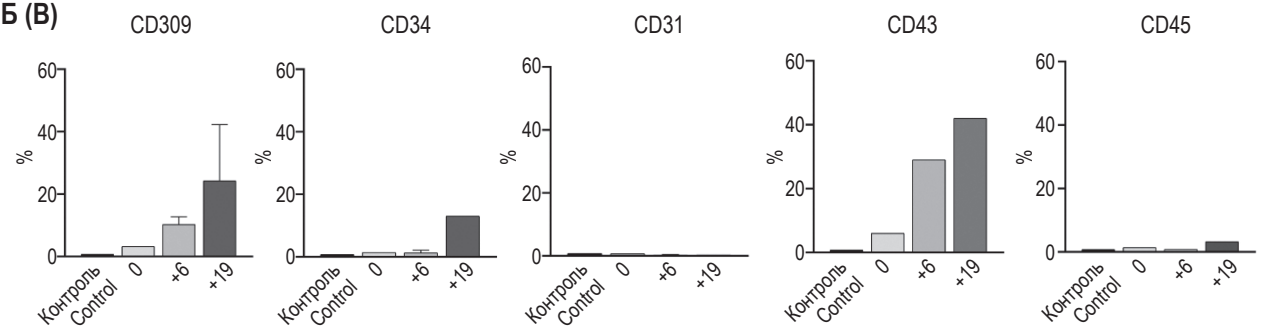


Рисунок 3. Дифференцировка с использованием фактор-зависимого протокола сопровождается ранним и выраженным изменением фенотипа дифференцирующихся клеток

Примечание. Приведен процент клеток, экспрессирующих указанные антигены на разных стадиях дифференцировки, при использовании фактор-зависимого (А) и «спонтанного» (Б) протоколов. Суммированные данные, полученные в 2-3 независимых дифференцировочных экспериментах. Ось X – дни дифференцировки; контроль – не меченый или изотип-контроль.

Figure 3. Factor-dependent protocol induces early and pronounced changes in the phenotype of differentiating cells

Note. Percentages of cells expressing the indicated antigens are shown. A, factor-dependent protocol; B, “spontaneous” protocol. Summarized data obtained in 2-3 independent differentiation experiments. X-axis, day of differentiation; control, unlabeled or isotype control.

по фактор-зависимому протоколу были успешными. В дифференцировках по «спонтанному» протоколу, которые в дальнейшем оказались не эффективными, на ранних стадиях дифференцировки нам не удалось зафиксировать появление клеток, экспрессирующих перечисленные выше маркеры.

Заключение

Полученные результаты указывают на CD309 и CD43 как на наиболее ранние и выраженные маркеры гемопоэтической дифференцировки и свидетельствуют о возможности их использования для ранней предикции эффективности гемопоэтической дифференцировки и ПСК.

Список литературы / References

- Garcia-Alegria E., Menegatti S., Fadlullah M.Z.H., Menendez P., Lacaud G., Kouskoff V. Early human hemogenic endothelium generates primitive and definitive hematopoiesis *in vitro*. *Stem Cell Rep.*, 2018, Vol. 11, no. 5, pp. 1061-1074.
- Goldenson B.H., Hor P., Kaufman D.S. iPSC-derived natural killer cell therapies – expansion and targeting. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 841107. doi: 10.3389/fimmu.2022.841107.
- Hu Y., Li Y., Yao Z., Huang F., Cai H., Liu H., Zhang X., Zhang J. Immunotherapy: review of the existing evidence and challenges in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2023, Vol. 15, no. 3, 563. doi: 10.3390/cancers15030563.
- Klepikova A., Nenasheva T., Sheveleva O., Protasova E., Antonov D., Gainullina A., Chikina E., Sakovnich O., Gerasimova T., Nikitina I., Shevalie D., Lyadova I. iPSC-derived macrophages: the differentiation protocol

affects cell immune characteristics and differentiation trajectories. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 24, 16087. doi: 10.3390/ijms232416087.

5. Lange L., Morgan M., Schambach A. The hemogenic endothelium: a critical source for the generation of PSC-derived hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 9, pp. 4143-4160.

6. Lyadova I., Gerasimova T., Nenasheva T. Macrophages derived from human induced pluripotent stem cells: The diversity of protocols, future prospects, and outstanding questions. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 640703. doi: 10.3389/fcell.2021.640703.

7. Lyadova I., Vasiliev A. Macrophages derived from pluripotent stem cells: Prospective applications and research gaps. *Cell Biosci.*, 2022, Vol. 12, 96. doi: 10.1186/s13578-022-00824-4.

8. Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Zakian S.M., Medvedev S.P. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res.*, 2020, Vol. 48, 101952. doi: 10.1016/j.scr.2020.101952.

9. Miyachi M., Ito Y., Nakahara F., Hino T., Nakamura F., Iwasaki Y., Kawagoshi T., Koya J., Yoshimi A., Arai S., Kagoya Y., Kurokawa M. Efficient production of human neutrophils from iPSCs that prevent murine lethal infection with immune cell recruitment. *Blood*, 2021, Vol. 138, no. 24, p. 2555-2569.

10. Sheveleva O., Protasova E., Nenasheva T., Butorina N., Melnikova V., Gerasimova T., Sakovnich O., Kurinov A., Grigor'eva E., Medvedev S., Lyadova I. A model of iPSC-derived macrophages with TNFAIP3 overexpression reveals the peculiarities of TNFAIP3 protein expression and function in human macrophages. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 16, 12868. doi: 10.3390/ijms241612868.

11. Takata K., Kozaki T., Lee C., Thion M.S., Otsuka M., Lim S., Utami K.H., Fidan K., Park D.S., Malleret B., Chakarov S., See P., Low D., Low G., Garcia-Miralles M., Zeng R., Zhang J., Goh C., Gul A., Hubert S., Lee B., Chen J., Low I., Shadan N-B., Lum J., Wei T-S., Mok E., Kawanishi S., Kitamura Y., Larbi A., Poidinger M., Renia L., Ng L-G., Wolf Y., Jung S., Önder T., Newell I., Huber T., Ashihara E., Garel S., Pouladi M., Ginhoux F. Induced-pluripotent-stem-cell-derived primitive macrophages provide a platform for modeling tissue-resident macrophage differentiation and function. *Immunity*, 2017, Vol. 47, pp. 183-198.

12. Trump L.R., Nayak R.C., Singh A.K., Emberesh S., Wellendorf A.M., Lutzko C.M., Cancelas J.A. Neutrophils derived from genetically modified human induced pluripotent stem cells circulate and phagocytose bacteria *in vivo*. *Stem Cells Transl. Med.*, 2019, Vol. 8, no. 6, pp. 557-567.

13. Wallis R.S., O'Garra A., Sher A., Wack A. Host-directed immunotherapy of viral and bacterial infections: past, present and future. *Nat. Rev. Immunol.*, 2023, Vol. 23, no. 2, pp. 121-133.

14. van Wilgenburg B., Browne C., Vowles J., Cowley S.A. Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, e71098. doi: 10.1371/journal.pone.0071098.

Авторы:

Шевелева О.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Россия

Ненасева Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Россия

Лядова И.В. — д.м.н., заведующая лабораторией ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук»; заведующая кафедрой клеточной биомедицины и клеточных технологий ПИШ ФГАУ ВО «Российский научно-исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sheveleva O.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nenasheva T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Lyadova I.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory, Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences; Head of the Department for Cell Biomedicine and Cell Technologies, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.03.2024

Отправлена на доработку 08.04.2024

Принята к печати 10.04.2024

Received 30.03.2024

Revision received 08.04.2024

Accepted 10.04.2024