

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633492>

# Применение генетически модифицированных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в тканевой инженерии суставного хряща

Н.С. Гаврилов, Н.В. Игнатьева, Е.В. Медведева, П.С. Тимашев

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

## АННОТАЦИЯ

Зрелый гиалиновый хрящ обладает низким регенеративным потенциалом, и его восстановление на сегодня представляет сложную клиническую и научную проблему. Травмы суставного хряща часто способствуют развитию остеоартрита и, как следствие, потере функциональности сустава и инвалидизации пациентов. Хирургические подходы к восстановлению суставных поверхностей, такие как мозаичная хондропластика и микрофрактурирование, применимые к небольшим размерам дефекта, не могут быть использованы при дегенеративно-дистрофических поражениях хряща. Клеточная терапия с использованием хондроцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), является перспективным направлением реконструкции тканей суставного хряща. ИПСК обладают высокой пролиферативной активностью, что позволяет получать аутологичные клетки в количестве, которое требуется для восстановления суставного дефекта индивида. Технология редактирования генома CRISPR-Cas, основанная на системе адаптивного иммунитета бактерий, даёт возможность генетически модифицировать ИПСК с целью получения клеток-прогениторов с заданными характеристиками и свойствами.

В данном обзоре собраны научные работы узкоспециализированной направленности, посвящённые комбинированию технологий ИПСК и CRISPR-Cas для исследований в области регенеративной медицины хряща. Мы аккумулировали статьи за последние двенадцать лет, с момента, когда метод CRISPR-Cas стал доступным мировому сообществу. Сегодня для решения терапевтических задач в области регенеративной медицины суставного хряща CRISPR-Cas применяется с целью повышения эффективности хондрогенной дифференцировки линий ИПСК и получения более гомогенной популяции хондропрогениторных клеток. Другим подходом является удаление последовательности рецепторов провоспалительных цитокинов для получения хрящевой ткани, невосприимчивой к воспалению. Наконец, нокаут генов компонентов главного комплекса гистосовместимости позволяет получать хондроциты, «невидимые» для иммунной системы реципиента. Исследования в данном направлении способствуют развитию персонализированной медицины и в перспективе ведут к повышению качества жизни населения в глобальной популяции.

**Ключевые слова:** CRISPR-Cas; редактирование генома; артикулярный хрящ; хондроциты; гипертрофия; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; хондрогенез; регенеративная медицина; тканевая инженерия.

## Как цитировать:

Гаврилов Н.С., Игнатьева Н.В., Медведева Е.В., Тимашев П.С. Применение генетически модифицированных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в тканевой инженерии суставного хряща // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 4. С. 404–424. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633492>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633492>

# Articular cartilage tissue engineering using genetically modified induced pluripotent stem cell lines

Nikita S. Gavrilov, Nadezda V. Ignatyeva, Ekaterina V. Medvedeva, Peter S. Timashev

The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia

## ABSTRACT

Mature hyaline cartilage has a low regenerative potential and its repair remains a complex clinical and research issue. Articular cartilage injuries often contribute to the development of osteoarthritis, resulting in loss of joint function and patient disability. Surgical techniques for repairing articular surfaces, such as mosaic chondroplasty and microfracture, which are designed for small defects, cannot be used for degenerative and dystrophic cartilage lesions. Cell therapy using chondrocytes differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) is a promising approach to reconstruct articular cartilage tissue. iPSCs have high proliferative activity, which allows the harvesting of autologous cells in quantities necessary to repair a joint defect. CRISPR-Cas genome editing technology, based on the bacterial adaptive immune system, enables the genetic modification of iPSCs to obtain progenitor cells with specific characteristics and properties.

This review describes specific research papers on the combined use of iPSC and CRISPR-Cas technologies for the evaluation of cartilage regenerative medicine. Papers were evaluated for the last twelve years since CRISPR-Cas technology was introduced to the global community. CRISPR-Cas is currently being used to address therapeutic issues in articular cartilage regeneration by increasing the efficiency of chondrogenic differentiation of iPSC lines and harvesting a more homogeneous population of chondroprogenitor cells. Another approach is to remove the pro-inflammatory cytokine receptor sequence to produce inflammation-resistant cartilage. Finally, knocking out genes for components of the major histocompatibility complex allows harvesting chondrocytes that are invisible to the recipient's immune system. This kind of research contributes to personalized healthcare and can improve the quality of life of the world's population in the long term.

**Keywords:** CRISPR-Cas; genome editing; articular cartilage; chondrocytes; hypertrophy; induced pluripotent stem cells; chondrogenesis; regenerative medicine; tissue engineering.

## To cite this article:

Gavrilov NS, Ignatyeva NV, Medvedeva EV, Timashev PS. Articular cartilage tissue engineering using genetically modified induced pluripotent stem cell lines. *Genes & cells*. 2024;19(4):404–424. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc633492>

Received: 17.06.2024

Accepted: 28.08.2024

Published online: 31.10.2024

## ВВЕДЕНИЕ

Гиалиновый хрящ сустава — это плотная, упругая стекловидная ткань, покрывающая суставные эпифизы костей. Артикулярный хрящ обеспечивает амортизацию при движении и снижает коэффициент трения суставных поверхностей, предотвращая их истирание [1, 2]. Повреждения тканей артикулярного хряща зачастую являются необратимыми, сопровождаются хронической болью и ведут к дестабилизации сустава и потере его функциональности. Разрушение тканей хряща происходит вследствие травмы либо дегенеративного заболевания [3, 4]. Например, остеоартрит бедренного и коленного суставов, одно из наиболее распространённых суставных заболеваний, находится на одиннадцатом месте в мире по инвалидизации населения [5]. Сегодня насчитывается уже около 240 млн случаев и прогнозируется дальнейший рост числа пациентов с остеоартритом в связи с ожидаемым увеличением средней продолжительности жизни населения [6, 7]. К разрушению структуры хряща и воспалительным процессам также приводит чрезмерная механическая нагрузка на суставные поверхности [8].

Несмотря на важность выполняемых функций, после повреждения ткани артикулярного хряща млекопитающих в значительной степени ограничены в регенерации нативной структуры. Существующие стратегии медикаментозного и хирургического лечения остеоартрита не приводят к восстановлению функциональности сустава в долгосрочной перспективе [8]. В перечень современных клинических подходов для восстановления тканей артикулярного хряща входят такие методы, как микрофрактурирование, мозаичная хондропластика, а также имплантация аутологических хондроцитов, известная в англоязычной литературе как метод ACI (autologous chondrocyte implantation) [9–11].

Метод микрофрактурирования заключается в перфорировании субхондральной кости в области повреждения тканей артикулярного хряща для обеспечения свободного доступа клеток костного мозга. Выполняется данная операция достаточно просто и не требует значительных материальных затрат [9, 10, 12, 13]. Однако, согласно клиническим исследованиям, микрофрактурирование демонстрирует лишь незначительное улучшение функциональных и радиологических показателей, даже при использовании новейших синтетических или биологических адьювантов [14].

Более хорошие клинические показатели демонстрирует мозаичная хондропластика, однако она применяется только к небольшим по площади повреждениям хряща, поскольку требуется перенос остеохондральных фрагментов в зону дефекта из областей со здоровой хрящевой поверхностью [15–17].

Технология восстановления хряща ACI ещё не введена в клиническую практику в России, однако заслуживает упоминания, поскольку ACI обладает коротким периодом послеоперационного восстановления и при этом является приемлемо эффективным методом хондропластики в случаях реконструкции небольших хрящевых повреждений. К недостаткам метода можно отнести возрастные ограничения, а также неизбежность дополнительного хирургического вмешательства для забора здоровых тканей хряща [8–10, 18].

Всё же, несмотря на широкое распространение в клинической практике описанных методов хондропластики, в подавляющем большинстве случаев сложная структура хрящевой ткани не восстанавливается, а на месте утраченного хряща формируется фиброзная ткань. Фиброхрящ имитирует ткани гиалинового хряща, однако значительно уступает ему по механическим свойствам, что с течением времени приводит к повторному изнашиванию тканей суставных поверхностей и развитию остеоартрита [10, 19]. Микрофрактурирование, мозаичная хондропластика и технология трансплантации аутологических хондроцитов по сути своей нацелены на отсрочку крайней меры — эндопротезирования сустава, сопровождающегося длительным периодом реабилитации. При эндопротезировании выживаемость имплантатов без ревизии составляет в среднем 63% за десять лет, при этом случаи осложнений включают инфицирование и асептическое расшатывание протеза [20, 21].

Ввиду всего вышеозвученного большие надежды возлагаются на разработку новых подходов к восстановлению тканей суставов на основе клеточной терапии. Работа с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК) в этом направлении представляется наилучшим вариантом, поскольку эти клетки обладают преимуществами эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), исключая при этом сложные аспекты этического характера, связанные с ЭСК человека.

Сегодня исследования хондрогенеза и научные разработки, нацеленные на лечение суставных заболеваний с участием ИПСК, ведутся в широком диапазоне интересов учёных. Представленный обзор литературы сфокусирован на узкоспециализированном направлении регенеративной медицины суставов, которое включает исследования с применением ИПСК, подвергнутых генетическим модификациям. Мы постарались аккумулировать научные работы с участием ИПСК в открытом доступе за последние двенадцать лет — период существования технологии геномного редактирования CRISPR-Cas, чтобы оценить уже реализуемые научные идеи по данной специализации, а также определить ещё не охваченные исследовательские направления.

## ХОНДРОЦИТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Неоспоримым преимуществом ИПСК является плюрипотентность. Плюрипотентные стволовые клетки способны неограниченно делиться, сохраняя способность к дифференцировке в клетки всех эмбриональных зародышевых листков: эктодермы, энтодермы и мезодермы [22, 23]. Впервые ИПСК были получены из культуры соматических клеток соединительной ткани при добавлении четырёх транскрипционных факторов (Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4), позднее названных факторами Яманаки [22, 24]. С тех пор перечень типов клеток человека, которые удалось репрограммировать в ИПСК, был значительно расширен [25]. На сегодняшний день возможно получение ИПСК из клеток легкодоступных биологических материалов: кератиноцитов волосяных фолликулов, клеток периферической крови (Т-клеток, В-клеток, гемопоэтических стволовых клеток и клеток костного мозга) и эпителиальных клеток, обнаруживаемых в моче [26].

В большинстве исследований с участием ИПСК их применяют для моделирования заболеваний *in vitro*, скрининга лекарств, создания биобанков, поиска молекулярных терапевтических мишеней и разработки новых способов лечения целого ряда заболеваний [27, 28]. Для регенеративной медицины ИПСК — это альтернативный источник получения клеток различных типов тканей для последующего применения в работах по изучению процессов восстановления повреждённых тканей с низким «от природы» регенеративным потенциалом, например тканей гиалинового хряща. На начало 2021 года насчитывалось 137 клинических исследований, в которых в той или иной форме фигурировали ИПСК, но только в 19 исследованиях аллогенные или аутологичные ИПСК были непосредственно задействованы в клеточной терапии пациентов [29], при этом среди них нет ни одной публикации по теме разработки терапевтических методов восстановления хрящевых тканей суставов.

Впервые эффективная хондрогенная дифференцировка *in vitro* была реализована в 2010 году с использованием ЭСК [30]. Далее хондроциты из ИПСК были получены при совместном культивировании ИПСК и первичной культуры хондроцитов [31]. Обзор текущих протоколов получения хондроцитов из ИПСК подробно представлен в статьях [10] и [32]. Ключевыми факторами, инициирующими хондрогенез, выступают белки суперсемейства трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ) [33–35]. Сигнальный путь TGF- $\beta$  регулирует клеточный цикл хондроцитов, их выживание, миграцию и переход к гипертрофированному состоянию. Белки TGF- $\beta$  стимулируют синтез классических маркёров

гиалинового хряща, таких как транскрипционный фактор SOX9, коллаген II типа и агреканы [33–35]. Большинство опубликованных протоколов описывает получение хондроцитов из ИПСК либо через стадию формирования из ИПСК трёхмерных клеточных агрегатов — эмбриоидных телец с последующим культивированием в мезенхимальной среде [36, 37], либо через непосредственную мезодермальную индукцию ИПСК с помощью подобранных коктейлей из активаторов сигнального пути WNT (например, низкомолекулярного соединения CHIR99021, ингибитора фермента GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), [38] или рекомбинантного белка Wnt3a [39]) и фактора роста BMP4 (bone morphogenetic protein 4) [39]; возможно добавление и других модуляторов [39]. Следующий за этим запуск хондрогенной дифференцировки проводят с добавлением синтетического глюкокортикоида дексаметазона и факторов хондрогенеза TGF- $\beta$ 1 [37, 40–42] или TGF- $\beta$ 3 [37, 42, 43], также применяют варианты протоколов с добавлением GDF5 (growth differentiation factor 5), FGF2 (fibroblast growth factor 2) и NT4 (neurotrophin 4/5) [39]. При этом дифференцировка стволовых клеток в хондроциты проходит эффективнее в трёхмерных культурах [44–46].

На сегодняшний день получение хондроцитов из ИПСК (ИПСК-хондроциты) и их имплантацию проводили в основном на животных моделях [47]. На модели остеоартрита коленного сустава кролика внутрисуставные инъекции ИПСК-хондроцитов человека привели к улучшению гистологической оценки тканей хряща по шкале ICRS (International Cartilage Repair Society) и снижению экспрессии маркёров воспаления [48]. Однако наилучшие результаты восстановления хрящевых повреждений принадлежат трёхмерным хрящевым имплантатам. У приматов при трансплантации аллогенных хрящевых органоидов, полученных из ИПСК, через 17 нед после операции обнаружили заполнение дефекта тканью, близкой по характеристикам к ткани нативного гиалинового хряща, в то время как в группе, где заживление дефекта проходило без участия хрящевых имплантатов, наблюдали формирование фиброзных тканей в области повреждения [49]. В представленном исследовании на приматах также продемонстрировано скопление CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов вокруг аллогенного хрящевого органоида при трансплантации в остеохондральный дефект, в то же время активация иммунных клеток не наблюдалась при трансплантации в область хондрального дефекта [49]. Иммунный ответ (либо его отсутствие) на аллогенный трансплантат в работе обусловлен различием хирургической модели суставного дефекта. Артикулярный хрящ состоит из плотного коллагенового матрикса, продуцируемого хондроцитами, и не содержит кровеносных сосудов, что обеспечивает его клеткам условную иммунологическую привилегированность в суставе [50, 51]. При формировании остеохондрального дефекта, в отличие от дефекта хондрального, нарушают целостность субхондральной кости, открывая

свободный доступ клеткам костного мозга, включая иммунные клетки, к аллогенному трансплантату [52]. Опираясь на полученные данные, авторы работы [49] утверждают, что аллогенная трансплантация вполне допустима при восстановлении хондральных дефектов, однако стоит помнить, что авторы проводили моделирование дефекта сустава на здоровых животных, в то время как в клинической практике разрушение хрящевой ткани сустава различной этиологии сопровождается воспалительными процессами в преобладающем количестве случаев [53].

При работе с ИПСК стоит помнить о рисках, сопровождающих их применение. В первую очередь это риск злокачественного перерождения получаемых ИПСК и их производных, обусловленный возникновением мутаций в процессе репрограммирования, длительного культивирования и направленной дифференцировки ИПСК [54–58]. К рискам применения ИПСК в клинической практике также относят их потенциальную туморогенность [10]. Производные ИПСК сохраняют риск формирования опухоли, связанный с потенциальным присутствием некоторого количества недифференцированных плюрипотентных клеток в трансплантируемой ткани [10], при этом в настоящее время ведутся разработки методов их селективного удаления [59–62]. Не стоит также исключать вероятность иммуногенности аутологичных ИПСК-продуктов: сингенные и аутологичные ИПСК и их производные зачастую инициируют иммунный ответ со стороны как Т-лимфоцитов [63, 64], так и НК-клеток (natural killer cells) [65, 66]. Сегодня утверждение о возможности имплантации сингенных и аутологичных ИПСК-производных вне применения иммуносупрессивной терапии является достаточно спорным [67].

Все вышесказанное обуславливает высокие требования, предъявляемые к линиям ИПСК, которые могут быть «допущены» до клинических исследований. Сопоставимость линий ИПСК имеет важное значение и требует согласования стандартизации производства этих клеток, их качественных характеристик и методов анализа. В настоящее время предлагаемые стандарты включают целый перечень требований [68, 69] к общим биологическим свойствам ИПСК, таким как клеточная морфология, клеточный цикл, нормальный кариотип и жизнеспособность. Кроме того, обязательно учитываются специфические свойства ИПСК: наличие определённого набора маркёров плюрипотентности и способность дифференцироваться по пути трёх зародышевых листков. В перечень общих стандартов для характеристики ИПСК также входят тестирование на микробиологическую стерильность и проверка на наличие остаточных компонентов системы репрограммирования. Линии полученных ИПСК подвергаются комплексному исследованию на хромосомную стабильность, что позволяет обнаружить генетические аномалии и хромосомные aberrации.

Тем не менее работа с ИПСК продолжается, и научным сообществом прорабатываются возможности нивелировать риски их применения с помощью не только

стандартизации характеристики линий ИПСК, но и, например, редактирования их генома посредством революционного метода CRISPR-Cas.

## СИСТЕМА РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR-CAS

С момента открытия двойной спирали ДНК технологии, позволяющие проводить различные манипуляции с молекулой ДНК, предоставили широкий спектр возможностей в биологических исследованиях. Однако внесение направленных изменений в определённую последовательность генома клеток или даже целых организмов долгое время казалось невыполнимой задачей. Первым методом для программируемого редактирования генома стало применение мегануклеаз, химерных нуклеаз типа «цинковые пальцы» (zinc finger nucleases, ZFNs) [70] и TAL-эффекторных нуклеаз (TALENs, transcription activator-like effector nucleases) [71], которые распознавали и расщепляли молекулу ДНК в заданных участках последовательности с последующей репарацией. Однако трудности, связанные с дизайном и синтезом подобного рода химерных белков, а также недостаточная эффективность стали препятствием для их широкого распространения.

Технология CRISPR-Cas9, представляющая возможность модификации генома, разработана на основе бактериальной системы CRISPR-Cas типа II, которая обеспечивает бактерии *Streptococcus pyogenes* адаптивным иммунитетом к патогенным вирусам (бактериофагам) [72–74]. Отличительной чертой системы CRISPR-Cas типа II является использование лишь одного белка эндонуклеазы Cas, в то время как другие типы, I и III, используют комплексы белков [72]. С помощью системы CRISPR-Cas9 бактерия распознаёт последовательность в составе геномной ДНК бактериофага и превентивно разрезает молекулу ДНК с помощью фермента-эндонуклеазы [72]. На основе описанной «адаптивной иммунной системы» бактерии и был разработан искусственный «редактор генома» CRISPR-Cas9.

Настоящим революционным прорывом в области эффективного редактирования генома высших организмов стала адаптация системы CRISPR-Cas9 в качестве инструмента редактирования генома за счёт создания в 2012 году химерной направляющей РНК для внесения двуцепочечных разрывов в интересующую последовательность ДНК [73, 74]. Технология CRISPR-Cas9 была быстро и широко принята научным сообществом как удобный и простой метод редактирования заданных участков в составе больших и сложных геномов высших организмов [74], который может быть легко введён в рутинную работу любой современной молекулярно-биологической лаборатории. Для его реализации требуются несколько основных компонентов: 1) структура crRNA

(CRISPR RNA), включающая последовательность РНК, благодаря которой происходит узнавание специфического участка нуклеотидной последовательности; 2) направляющая РНК (*tracrRNA*), связывающаяся с эндонуклеазой; 3) белок Cas9, эндонуклеаза, осуществляющая сайт-специфичный двуцепочечный разрыв молекулы ДНК [74]. Впоследствии была разработана *sgRNA* (*single guide RNA*), выполняющая функции дуплекса *tracrRNA/crRNA* [74]. Теперь, в отличие от нуклеаз ZFNs и TALENs, которые требуют существенных затрат для конструирования белков под каждую отдельно взятую задачу, системе CRISPR-Cas9 нужны только изменения последовательности *sgRNA*, распознающей целевую последовательность геномной ДНК. В лабораторных исследованиях данный метод позволяет осуществлять разрыв нуклеотидной последовательности определённого участка ДНК, после чего в образовавшийся разрыв может быть встроены фрагмент практически любой нуклеотидной последовательности, включая даже целые гены [74]. Метод редактирования генома CRISPR-Cas9 можно использовать для таких целей, как внесение точечных мутаций, удаление или встраивание в определённые участки стронных генов и их фрагментов, а также замена отдельных нуклеотидных последовательностей.

Различные способы доставки системы CRISPR-Cas9 принято делить на вирусные, включающие рекомбинантные вирусные векторы на основе аденоассоциированного вируса, лентивируса или аденовируса, и невирусные (включая физические подходы) [75]. К невирусным и физическим способам доставки системы CRISPR-Cas9 в клетки-мишени относят микроинъекции, метод электропорации, метод механической клеточной деформации, гидродинамические инъекции, а также перенос на полимерных наночастицах, липидных наночастицах, золотых наночастицах и т.д. [75]. Доступность и экономическая целесообразность невирусных систем доставки системы CRISPR-Cas9 сделали их более привлекательными для применения по сравнению с вирусными системами доставки [75]. Физические и невирусные методы доставки CRISPR-Cas9 подходят для создания модификации в клеточных линиях; для терапии *in vivo* их практически не применяют [76]. Напротив, вирусные системы доставки до сих пор являются наиболее эффективными системами для доставки плазмидных нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo* [76], несмотря на связанный с их применением повышенный риск попадания в редактируемый геном нежелательных мутаций [77–79].

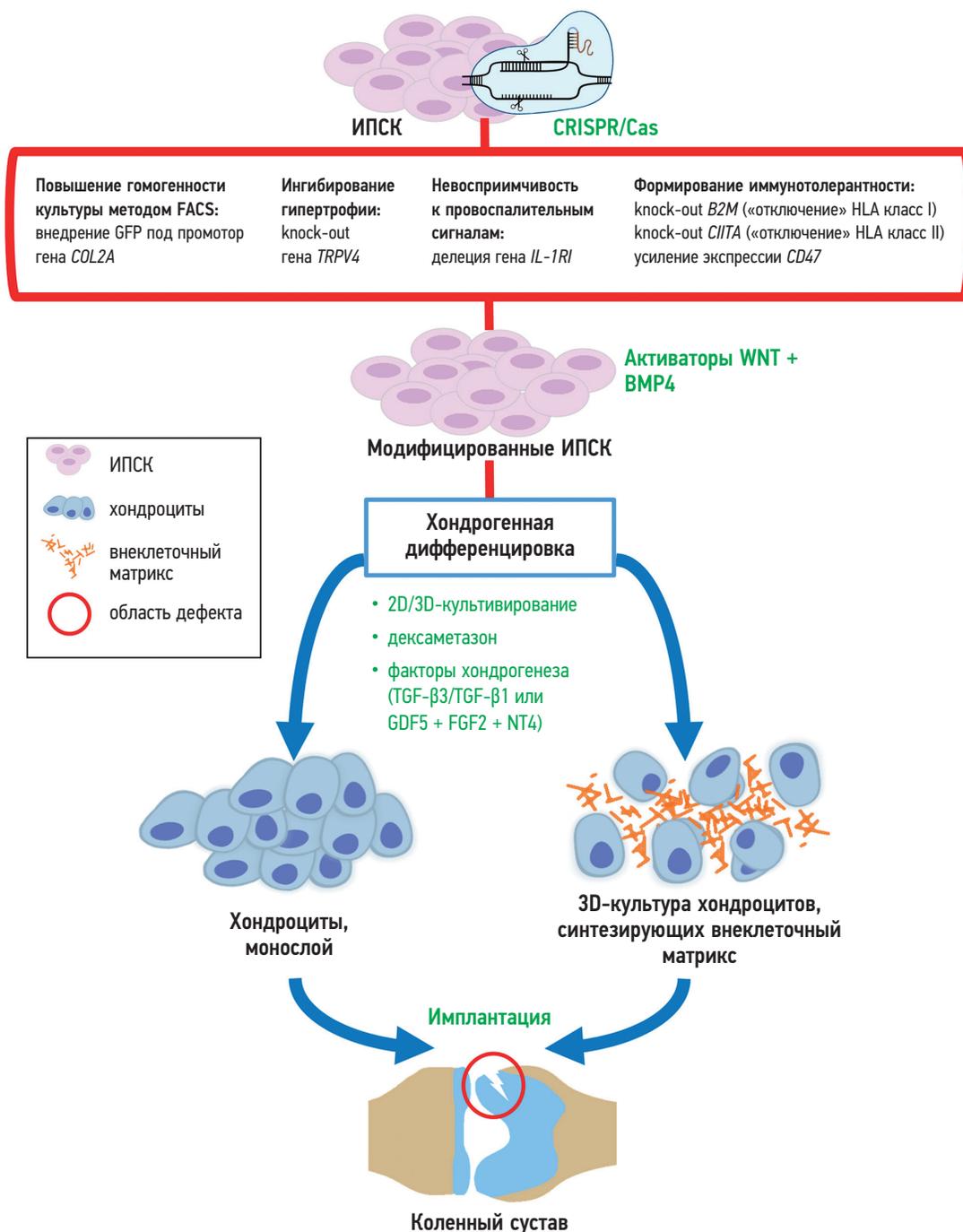
При использовании системы CRISPR-Cas9 остаётся ненулевая вероятность редактирования генома за пределами целевого участка ДНК. Минимизировать потенциальные нецелевые эффекты и повысить эффективность применения CRISPR-Cas9 помогут использование парной Cas9-никазы, рациональное проектирование *sgRNA* и правильный подбор целевого сайта редактирования [75].

В научно-исследовательской среде технология CRISPR-Cas9 в короткие сроки получила широкое распространение и была активно внедрена в исследования в различных областях: сельское хозяйство, фундаментальная и прикладная биология, клеточная биология, регенеративная медицина, а также лечение генетических заболеваний [80–83]. Различные варианты редактирования генома применены и к задачам модификации клеточных культур с целью изучения и поиска способов регуляции течения процессов хондрогенной дифференцировки (рис. 1).

## ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТЕЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ХОНДРОГЕНЕЗА И ИНСТРУМЕНТ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ СУСТАВОВ

Генетическая модификация ИПСК является относительно новым и эффективным инструментом для исследования процессов хондрогенеза и разработки восстановительной терапии в регенеративной медицине суставов. Путём активации и подавления с помощью геномного редактирования определённых сигнальных путей становится возможным контролировать эффективность хондрогенной дифференцировки, сохранять фенотип хондроцитов в процессе культивирования, регулировать чувствительность хондроцитов к провоспалительным агентам, а также моделировать генетические заболевания, связанные с нарушением процессов хондрогенеза (см. рис. 1).

Одним из препятствий для работы с ИПСК в качестве источника хондроцитов для нужд регенеративной медицины суставов является гетерогенность клеточной популяции, получаемой по завершении протокола хондрогенной дифференцировки ИПСК. Иными словами, полученные ИПСК-производные могут различаться по степени своей хондрогенной дифференцированности, а также какая-то часть клеток может пойти по пути дифференцировки в другие клеточные линии. S.S. Adkar и соавт. в 2019 году [84] предложили повысить гомогенность хондрогенной популяции, дифференцированной из линий ИПСК человека, методом отбора клеток с наилучшими хондрогенными свойствами, ориентируясь на белки-маркеры хондрогенеза. С помощью редактора CRISPR-Cas были получены генетически модифицированные линии ИПСК человека, продуцирующие зелёный флуоресцирующий белок GFP (*green fluorescent protein*) под промотором гена *COL2A*, кодирующего один из основных хондрогенных маркеров — коллаген II типа [84]. ИПСК человека, содержащие



**Рис. 1.** Применение генетически модифицированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) для восстановления суставной поверхности. Схематическое изображение пошаговой работы с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками для восстановления дефекта суставной поверхности с указанием стратегий редактирования генома, направленных на увеличение эффективности клеточной терапии. FACS — fluorescence-activated cell sorting (клеточная сортировка, активируемая флуоресценцией); B2M —  $\beta$ 2 microglobulin ( $\beta$ -2-микроглобулин); COL2A — collagen type II,  $\alpha$  (коллаген типа II, субъединица  $\alpha$ ); FGF2 — fibroblast growth factor 2 (Basic) (фактор роста фибробластов 2); GDF5 — growth differentiation factor 5 (фактор роста и дифференцировки 5); HLA — human leukocyte antigen (человеческий лейкоцитарный антиген); IL-1RI — interleukin 1 receptor type 1 (рецептор интерлейкина 1, тип 1); NT4 — neurotrophin 4/5 (нейротрофический фактор 4/5); TGF- $\beta$  — transforming growth factor  $\beta$  (трансформирующий фактор роста  $\beta$ ); TRPV4 — transient receptor potential vanilloid 4 (катионный канал с переходным потенциалом рецептора, подсемейство V, член 4).

**Fig. 1.** Use of genetically modified induced pluripotent stem cells (iPSCs) for articular surface repair. Step-by-step diagram for using induced pluripotent stem cells to repair articular surface defects, highlighting genome editing strategies to enhance the efficacy of cell therapy. FACS, fluorescence-activated cell sorting; B2M,  $\beta$ 2 microglobulin; COL2A, collagen type II,  $\alpha$ ; FGF2, fibroblast growth factor 2 (Basic); GDF5, growth differentiation factor 5; HLA, human leukocyte antigen; IL-1RI, interleukin 1 receptor type 1; NT4, neurotrophin 4/5; TGF- $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TRPV4, transient receptor potential vanilloid 4.

генетическую модификацию COL2A-GFP, культивировали в течение четырёх недель в хондрогенной среде. После завершения процесса дифференцировки клетки сортировали по интенсивности продуцируемого ими GFP-сигнала, контролируя однородность получаемых хондрогенных клеток. Подобная стратегия позволила авторам работы отобрать из общего пула те клетки, которые демонстрировали наилучшие хондрогенные характеристики [84]. Авторы уверены, что повышение однородности клеточной популяции ИПСК-хондроцитов позволит в будущем улучшить качество и воспроизводимость получаемых ИПСК-продуктов.

В 2020 году A. Dicks и соавт. продолжили исследования на линии ИПСК человека, содержащей генетическую модификацию COL2A-GFP [85]. Авторы предположили, что COL2A-положительные клетки, являясь «истинными» хондрогениторами, обладают уникальным профилем поверхностных маркёров, определив который, в дальнейшем можно будет избежать генетической модификации COL2A-GFP для ИПСК-хондроцитов. Редактированные ИПСК человека культивировали в хондрогенной среде на протяжении 12 дней, после чего методом клеточной сортировки с помощью активируемой флуоресценции были отобраны клетки с высоким флуоресцентным сигналом GFP (в среднем 4,2% всех клеток). Поскольку поверхностные маркёры PDGFR $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ ), CD146 или CD166 наиболее сильно коррелировали с экспрессией гена COL2A1, клетки были отсортированы на основе экспрессии этих маркёров. Далее был проведён анализ транскриптома полученной PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>/CD166<sup>+</sup> популяции методом секвенирования РНК единичной клетки (scRNAseq) [85]. Анализ данных показал наличие шести субпопуляций в составе отобранных клеток. Популяция хондрогениторов CD146<sup>+</sup>/CD166<sup>+</sup>/PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, составившая около 16,8% от общей популяции COL2A-GFP хондрогениторных клеток, по заключению авторов, обладала более высоким хондрогенным потенциалом [85]. При 3D-культивировании хондрогениторов CD146<sup>+</sup>/CD166<sup>+</sup>/PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> в формате тканевых гранул (*англ.* pellets) экспрессия генов хондрогенных маркёров (SOX9, COL2A, ACAN) была выше по сравнению с аналогичной культурой несортированных COL2A-положительных клеток, однако экспрессия генов COL1A1 и COL10A1 также была выше [85]. На основе полученных данных авторы заключили, что сортировка хондрогенных предшественников, получаемых из ИПСК человека, по наличию поверхностных маркёров способствует улучшению хондрогенной дифференцировки и повышает гомогенность клеточной культуры [85].

Другой сложностью работы с хондроцитами является нестабильность их фенотипа в условиях *in vitro* [46, 86]. Хондроциты, созревая, перестраиваются в гипертрофированные хондроциты, что в свою очередь считается началом перехода хондроцитов в фибробластоподобные

клетки или в клетки остеогенной линии [87]. Генетическая модификация ИПСК человека с помощью системы CRISPR-Cas9 была проведена Т. Katakura и соавт. с целью оценить роль коллагена X типа, кодируемого геном COL10A1, в процессе перехода хондроцита в гипертрофированное состояние [88]. Для достижения цели исследования получены линии ИПСК человека с гетерозиготными (COL10A1<sup>+/-</sup>) или гомозиготными (COL10A1<sup>-/-</sup>) делециями всего кодирующего участка гена COL10A1. Несколько мутантных клонов были дифференцированы в клетки с признаками гипертрофированных хондроцитов, при этом заметных различий в процессе дифференцировки между исходными и мутантными клеточными линиями не наблюдалось [88]. Чтобы оценить последствия нокаута гена COL10A1 в условиях *in vivo*, из ИПСК человека центрифугированием формировали гранулы (pellets) и культивировали их в хондрогенной среде для инициации дифференцировки и наработки клетками внеклеточного матрикса. На разных стадиях дифференцировки полученные клеточные гранулы трансплантировали подкожно мышам иммунодефицитной линии. Гистологическая оценка срезов тканей после имплантации, а также анализ транскриптома не выявили существенных различий между гранулами COL10A1<sup>+/-</sup> и COL10A1<sup>-/-</sup> хондроцитов. Авторы заключили, что недостаток коллагена X типа не оказывает влияния на процессы гипертрофии ИПСК-хондроцитов, однако недостаток коллагена X типа в тканях хряща облегчает процесс дифференцировки клеток в гипертрофированные хондроциты посредством пока ещё не известного механизма [88, 89].

Переход хондроцитов в гипертрофированное состояние является важным этапом процесса эндохондрального окостенения хряща при развитии и росте скелета [90, 91]. В 2023 году A.R. Dicks и соавт. использовали генетическую модификацию ИПСК человека для моделирования молекулярных механизмов заболеваний, вызванных нарушением процесса формирования скелета [92]. Термин «скелетные дисплазии» объединяет гетерогенную группу сравнительно редко встречающихся системных нарушений остеогенеза. Мутации в ионном канале TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) вызывают ряд скелетных дисплазий, однако механизмы нарушения, обуславливающие различную тяжесть заболевания, остаются неизвестными. Для прояснения молекулярных основ развития скелетных дисплазий, обусловленных мутациями в гене TRPV4, и их влияния на хондрогенную дифференцировку с помощью технологии CRISPR-Cas9 получены ИПСК человека, несущие мутацию V620I (умеренная брахиолмия) или летальную мутацию T89I (метатропическая дисплазия) [92, 93]. В ходе исследования обнаружено, что хондроциты, дифференцированные из контрольных ИПСК, активировали экспрессию генов маркёров гипертрофии в ответ на добавление к клеточной среде морфогенного фактора BMP4. Однако в мутантных хондроцитах

процесс гипертрофического созревания не происходил. Результаты исследования показали, что мутации в гене TRPV4 изменяют передачу сигналов BMP в клетках и предотвращают формирование гипертрофированных хондроцитов, что является потенциальным механизмом дисфункционального развития скелета [92].

Клеточная терапия на основе хондрогенных ИПСК-продуктов нацелена на восстановление тканей, повреждённых при травмах и дегенеративных суставных заболеваниях, которые сопровождаются воспалительными процессами. Ткани повреждённого сустава активно синтезируют провоспалительные цитокины, подавляющие пролиферацию хондроцитов и инициирующие разрушение хрящевого матрикса посредством металлопротеиназ [94–96]. Препараты-антагонисты провоспалительных цитокинов могут быть эффективны, однако обладают серьёзными побочными эффектами, ограничивающими их применение [97, 98]. Например, терапия, направленная на ингибирование синтеза фактора некроза опухоли, способна вызывать у пациентов кожный васкулит, системную красную волчанку, волчанко-подобный синдром и саркоидоз [97]. Получение тканевых конструктов, устойчивых к воздействию провоспалительных агентов, ввиду вышесказанного представляется весьма актуальной задачей. Провоспалительный цитокин интерлейкин-1 (interleukin, IL-1) способен ингибировать хондрогенную дифференцировку, что приводит к деградации тканей хряща, получаемых из ИПСК [99, 100]. J.M. Brunger и соавт. [98] редактировали геном мышинных ИПСК с помощью технологии CRISPR-Cas9 для подавления влияния воспалительных процессов на клетки искусственно выращенных из ИПСК хрящевых тканей, пытаясь сохранить их хондрогенные свойства при имплантации в сустав. Авторы получили линию клеток, устойчивых к воспалительным процессам, посредством гомозиготной и гетерозиготной делеции гена *IL-1RI*, кодирующего рецептор IL-1 [98, 101]. Отсутствие поверхностного белка IL-1RI в отредактированных ИПСК подтверждали с помощью проточной цитометрии, а отсутствие передачи сигналов — с помощью анализа транскрипции репортеров. Обработка цитокином IL-1 показала, что модифицированная клеточная линия *IL-1RI<sup>-/-</sup>* обладала полной невосприимчивостью к провоспалительному цитокину, в отличие от исходных клеток и клеток с гетерозиготной делецией. На основе полученных *IL-1RI<sup>-/-</sup>* ИПСК в ходе хондрогенной дифференцировки сформированы микроткани (трёхмерные клеточные гранулы), которые не были подвержены цитокин-опосредованной деградации и сохраняли экспрессию маркёров хрящевой ткани *in vivo* [98]. Данная исследовательская работа продвигает концепцию об эффективности и целесообразности применения генетически модифицированных ИПСК, невосприимчивых к провоспалительным цитокинам, в качестве потенциального источника стволовых клеток для инженерии хрящевой ткани [98].

## ПОЛУЧЕНИЕ ЛИНИЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ХОНДРОГЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Применение ИПСК не ограничивается аутологичной трансплантацией, и роль аллотрансплантатов не следует недооценивать [102]. ИПСК способны пролиферировать и дифференцироваться в той же степени, что и ЭСК [103], однако в свете новых данных существуют обоснованные опасения, что иммуногенность аутологичных ИПСК может меняться в процессе репрограммирования и дифференцировки, вызывая иммунный ответ при трансплантации [104]. Кроме того, трудоёмкость создания и сертификации индивидуальных линий ИПСК из соматических клеток для каждого отдельного пациента требует значительных временных и материальных затрат [67, 105]. В то же время способность ИПСК к самовоспроизведению и возможность длительного хранения клеток в биобанках позволяют значительно снизить стоимость и ускорить производство аллогенных ИПСК-продуктов по сравнению с персонифицированными вариантами. При этом получение аллогенных хрящевых имплантатов из сертифицированных ИПСК для широкого круга пациентов позволит решить проблемы, неразрывно связанные с «классической» трансплантацией тканей аллогенного хряща, такие как нехватка донорского материала, различия в качестве хряща между донорами и вероятность передачи заболеваний от донора к реципиенту.

Однако получить донорские клетки с соответствующим локусом главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex), чтобы избежать реакции отторжения трансплантата организмом реципиента, достаточно сложно: большое разнообразие типов белков лейкоцитарного антигена человека (HLA, human leukocyte antigen), компонентов МНС человека, является причиной сложности подбора доноров и основной причиной отторжения трансплантатов вследствие генетических различий между донором и реципиентом [106, 107].

Изобретательно к решению проблемы иммуносовместимости аллогенных ИПСК подошли в Японии (идея принадлежит профессору S. Yamanaka). В 2013 году на базе Киотского университета было инициировано создание биобанка для хранения ИПСК от доноров, гомозиготных по аллелям человеческого лейкоцитарного антигена HLA-A, HLA-B и HLA-DRB1 — трём наиболее важным элементам иммунореактивности [108]. Клетки, полученные из этих линий ИПСК, можно будет трансплантировать реципиентам, гетерозиготным по тем же гаплотипам HLA, значительно снизив риски отторжения тканей. Для населения Японии характерно низкое разнообразие

гаплотипов HLA [109]. Согласно подсчётам, 140 уникальных доноров, гомозиготных по HLA, иммуносовместимы с ~90% населения Японии; и для их идентификации потребуется типировать приблизительно 160 000 человек [109]. На начало 2023 года организация CiRA (Center for iPS Cell Research and Application, Киото, Япония) сообщила о создании и клинических испытаниях линий ИПСК от семи доноров, охватывающих четыре наиболее часто встречающихся среди японцев гаплотипа HLA и покрывающих ~40% населения Японии [108]. Реализуемая Японией стратегия банкирования ИПСК, гомозиготных по HLA, эффективна для генетически однородной и/или небольшой по численности популяции, например населения Калифорнии [110] или Великобритании [111]. Однако представленный подход не применим в рамках Российской Федерации, поскольку Россия характеризуется исключительно высокой гетерогенностью как в этническом, так и в генетическом плане [112, 113], что делает подобное мероприятие дорогостоящим, а эффективность подхода — зависящей от случайного обнаружения желаемых гомозиготных гаплотипов HLA.

Другим подходом к решению проблемы иммунологической совместимости трансплантатов, произведённых из аллогенных ИПСК, является редактирование генома клеточной линии для получения ИПСК со сниженной иммуногенностью, позволяющей им быть «невидимыми» для иммунных клеток [105]. Для повышения иммуносовместимости получаемых из ИПСК хондроцитов Y. Jang и соавт. [114] нокаутировали лейкоцитарный антиген человека HLA-B в ИПСК, гомозиготных по HLA-A и гетерозиготных по HLA-B, с помощью системы CRISPR-Cas9. В результате получена гомозиготная по HLA-A линия ИПСК без HLA-B. По результатам теста на определение комплемент-опосредованной цитотоксичности модифицированные ИПСК демонстрировали меньшую иммуногенность *in vitro* по сравнению с контрольной группой, при этом ИПСК сохраняли плюрипотентные свойства, а также способность дифференцироваться в хондроциты *in vitro* и формировать тератомы *in vivo* [114].

Согласно опубликованным данным, хондроциты обладают иммуномодулирующим и иммуносупрессивным свойствами и способны оказывать влияние на иммунокомпетентные клетки [115]. В 2010 году H.D. Adkisson и соавт. [116] проанализировали ювенильные и взрослые хондроциты, полученные от здоровых пациентов, и пришли к выводу, что хондроциты продуцируют только молекулы MHC класса I и практически не экспрессируют на постоянной основе необходимые для T-клеточного ответа белки MHC класса II, а также не синтезируют лиганды B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), стимулирующие T-клеточный ответ через рецептор CD28 и угнетающие T-клетки через взаимодействие с рецептором CTLA-4 (cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4) [117]. В дополнение к этому в хондроцитах обнаружены отрицательные регуляторы иммунного ответа ChM-I (chondromodulin-I) и IDO (indoleamine

2,3-dioxygenase), а также конститутивная продукция LLT1 (lectin-like transcript 1), лиганда рецептора NKR-P1A (CD161), ингибирующего NK-клетки [116]. Однако молекулы MHC класса II детектируются на поверхности суставных хондроцитов у пациентов с ревматоидным артритом и остеоартритом [118].

Анализ иммуномодулирующих свойств клеточной линии первичных хондроцитов, полученных от пациентов с полидактилией, также показал, что клетки не экспрессировали молекулы MHC класса II и CD80 и CD86, но продуцировали коингибитор T-клеточного ответа PD-L2 (CD273) [119]. Не обнаружены белки MHC класса I и II на поверхности хондроцитов, выделенных из интактных тканей артикуляционного хряща быка/коровы и кролика [120].

Опираясь на ранее представленные данные, Y. Okutani и соавт. [41] выдвинули гипотезу о том, что генетически модифицированные ИПСК, не способные продуцировать молекулы MHC класса I, вследствие направленной хондрогенной дифференцировки приобретут иммуномодулирующие свойства зрелых хондроцитов, и это будет способствовать снижению цитотоксичности T-лимфоцитов и NK-клеток при аллогенной трансплантации в суставной дефект. В своей работе Y. Okutani и соавт. [41] исследовали хондрогенные и иммуногенные свойства трёхмерных сфероидов из ИПСК, лишённых белков MHC класса I вследствие нокаута гена *B2M*, кодирующего  $\beta$ -2-микроглобулин. Нокаут в клетках по гену *B2M* для инактивации HLA класса I применяется достаточно часто [121–123]. Функциональные комплексы HLA класса I являются гетеродимерами и состоят из тяжёлой  $\alpha$ -цепи с высокой степенью полиморфизма и консервативной лёгкой цепи  $\beta$ -2-микроглобулина. Нокаут консервативного гена *B2M* препятствует синтезу функционального белка и формированию гетеродимеров, позволяя «отключить» сразу все белки HLA класса I (HLA-A, -B, -C, -E, -F и -G) на поверхности клетки. Нокаутированные по *B2M* ИПСК приматов собирали в трёхмерные хондрогенные сфериды для аллогенной имплантации в остеохондральный дефект коленного сустава, включив по две особи в исследуемую (*B2M*<sup>-/-</sup>) и контрольную (*B2M*<sup>+/+</sup>) группы [41]. Согласно данным, полученным через 4 нед после операции, имплантация хондрогенных *B2M*<sup>+/+</sup> и *B2M*<sup>-/-</sup> сфероидов сопровождалась аккумуляцией иммунных клеток в области субхондральной кости у всех четырёх обезьян. При этом скопление CD3<sup>+</sup> T-лимфоцитов наблюдали преимущественно вокруг *B2M*<sup>+/+</sup> имплантатов, в то время как аккумуляция NKG2A-позитивных NK-клеток преобладала в группе *B2M*<sup>-/-</sup> [41].

Полученные результаты согласуются с другими научными работами [124], которые подтверждают, что инактивация гена *B2M* в клетках при аллогенной трансплантации предотвращает инфильтрацию цитотоксических T-клеток путём истощения всех молекул HLA класса I, однако отсутствие белков HLA на поверхности клеток активирует иммунный ответ NK-клеток [66]. Известно,

что на поверхности NK-клеток располагаются ингибирующие рецепторы KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor), для которых молекулы HLA класса I являются лигандами (HLA-E, HLA-C и часть HLA-B у человека [125]). Когда NK-клетки распознают эти лиганды на соматических клетках, цитотоксическая активность NK-клеток подавляется ингибирующими сигналами [124]. Этот феномен известен как механизм распознавания «отсутствия своего» (“missing-self recognition”) [126].

Сегодня для индукции иммунной толерантности к аллогенным трансплантатам предлагается стратегия создания ИПСК путём разрушения обоих аллелей HLA-A и HLA-B с сохранением HLA-C, что позволяет уклоняться от T-клеток и NK-клеток *in vitro* и *in vivo* [127]. Согласно подсчётам, при дополнении таких генетически модифицированных ИПСК нокаутом по HLA класса II (например, через инактивацию гена, кодирующего СИТА (class II major histocompatibility complex transactivator) [121, 123, 128, 129]), набора всего из 12 клеточных линий (соответствующих 12 гаплотипам HLA-C), будет достаточно для иммунологической совместимости с ~90% населения мира [123, 127].

В качестве альтернативной стратегии получения гипоиммуногенных ИПСК, в дополнение к инактивации МНС класса I и II, применяют регуляцию экспрессии трансмембранного белка CD47 [105], одна из функций которого заключается в ингибировании активации NK-клеток. Продемонстрировано, что при аллогенной трансплантации инактивация МНС класса I и II в ИПСК, дополненная усилением экспрессии CD47 через лентивирусную трансдукцию, значительно снижает иммуногенность полученных линий на примере ИПСК мышей, приматов и человека даже в условиях отсутствия иммуносупрессивной терапии [128, 130].

Инженерия гипоиммунных ИПСК и их производных, нацеленная на избегание иммунного распознавания с помощью врождённого и адаптивного иммунитета, на сегодня видится крайне перспективной стратегией для реализации терапии на основе аллогенной трансплантации в клинической практике. Однако стоит помнить, что помимо онкогенности и туморогенности, присущих самим ИПСК, редактирование их генома с помощью CRISPR-Cas может дополнительно приводить к непредвиденным мутациям как в целевом, так и в нецелевых участках генома [131–134]. Сегодня продолжает развиваться и методологическая база для выявления приобретаемых отредактированными линиями ИПСК возможных генетических дефектов, таких как инсерции, микроделеции и потеря гетерозиготности, тем самым улучшая профили безопасности и эффективности применения CRISPR-Cas-редактирования к ИПСК [131, 135, 136]. Важно отметить, что лучшая выживаемость иммунотолерантных ИПСК-производных вследствие ухода от иммунного надзора потенциально может создавать угрозу роста опухолей, «невидимых» для иммунной системы реципиента [137].

С учётом вышесказанного тщательная проверка и сертификация ИПСК и ИПСК-продуктов, получаемых для решения терапевтических задач, требуют значительных затрат времени и ресурсов, но являются обязательными шагами в работе с генетически модифицированным трансплантационным материалом [69].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время технологии в биомедицине развиваются стремительно. Технология получения линий ИПСК, содержащих требуемую генетическую модификацию, расширяет горизонты в области регенеративной и персонализированной медицины. Модификация ИПСК позволяет решать сложные биологические задачи, связанные с аутологичной и аллогенной трансплантацией. Редактирование генома даёт возможность получать линии ИПСК, «склонные» к хондрогенной дифференцировке, либо линии ИПСК, способные при культивировании препятствовать формированию гипертрофированных хондроцитов из хондропротениторов, что позволяет приблизиться к решению непосредственно прикладных медицинских задач, а также отыскать мишени, облегчающие и/или стимулирующие хондрогенез в условиях *in vitro* и впоследствии — *in vivo*.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10082).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Н.С. Гаврилов — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста статьи; Н.В. Игнатъева — концепция научной работы, сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста статьи; Е.В. Медведева — концепция научной работы, анализ литературных источников, написание текста статьи, редактирование текста с внесением ценного интеллектуального содержания; П.С. Тимашев — критический анализ работы, редактирование текста с внесением ценного интеллектуального содержания.

## ADDITIONAL INFORMAIION

**Funding source.** This work was supported by the Russian Science Foundation (grant number 21-75-10082).

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contribution.** All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). N.S. Gavrilov — literature

review, collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text of the article; N.V. Ignatyeva — conceptualization, literature review, collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text of the article; E.V. Medvedeva — conceptualization, analysis of literary sources, writing the text, review and editing of the article; P.S. Timashev — review and editing of the article.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kheir E., Shaw D. Hyaline articular cartilage // *Orthop Trauma*. 2009. Vol. 23, N. 6. P. 450–455. doi: 10.1016/j.mporth.2009.01.003
2. Bhosale A.M., Richardson J.B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management // *Br Med Bull*. 2008. Vol. 87. P. 77–95. doi: 10.1093/bmb/ldn025
3. Swieszkowski W., Tuan B.H.S., Kurzydowski K.J., Hutmacher D.W. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints // *Biomol Eng*. 2007. Vol. 24, N. 5. P. 489–495. doi: 10.1016/j.bioeng.2007.07.014
4. Buckwalter J.A. Articular cartilage injuries // *Clin Orthop Relat Res*. 2002. Vol. 402. P. 21–37. doi: 10.1097/00003086-200209000-00004
5. Giorgino R., Albano D., Fusco S., et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? An update // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N. 7. P. 6405. doi: 10.3390/ijms24076405
6. GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 // *Lancet Rheumatol*. 2023. Vol. 5, N. 9. P. e508–e522. doi: 10.1016/S2665-9913(23)00163-7
7. Allen K.D., Thoma L.M., Golightly Y.M. Epidemiology of osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage*. 2022. Vol. 30, N. 2. P. 184–195. doi: 10.1016/j.joca.2021.04.020
8. Muthu S., Korpershoek J.V., Novais E.J., et al. Failure of cartilage regeneration: emerging hypotheses and related therapeutic strategies // *Nat Rev Rheumatol*. 2023. Vol. 19, N. 7. P. 403–416. doi: 10.1038/s41584-023-00979-5
9. Nam Y., Rim Y.A., Lee J., Ju J.H. Current therapeutic strategies for stem cell-based cartilage regeneration // *Stem Cells Int*. 2018. Vol. 2018. P. 8490489. doi: 10.1155/2018/8490489
10. Lach M.S., Rosochowicz M.A., Richter M., et al. The induced pluripotent stem cells in articular cartilage regeneration and disease modelling: are we ready for their clinical use? // *Cells*. 2022. Vol. 11, N. 3. P. 529. doi: 10.3390/cells11030529
11. Medvedeva E.V., Grebenik E.A., Gornostaeva S.N., et al. Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, N. 8. P. 2366. doi: 10.3390/ijms19082366
12. Schrock J.B., Kraeutler M.J., Houck D.A., et al. A cost-effectiveness analysis of surgical treatment modalities for chondral lesions of the knee: microfracture, osteochondral autograft transplantation, and autologous chondrocyte implantation // *Orthop J Sports Med*. 2017. Vol. 5, N. 5. P. 2325967117704634. doi: 10.1177/2325967117704634
13. Kreuz P.C., Steinwachs M.R., Erggelet C., et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee // *Osteoarthritis Cartilage*. 2006. Vol. 14, N. 11. P. 1119–1125. doi: 10.1016/j.joca.2006.05.003
14. Muthu S., Viswanathan V.K., Sakthivel M., Thabrez M. Does progress in microfracture techniques necessarily translate into clinical effectiveness? // *World J Orthop*. 2024. Vol. 15, N. 3. P. 266–284. doi: 10.5312/wjo.v15.i3.266
15. Inderhaug E., Solheim E. Osteochondral autograft transplant (mosaicplasty) for knee articular cartilage defects // *JBJS Essent Surg Tech*. 2019. Vol. 9, N. 4. P. e34.1–e34.2. doi: 10.2106%2FJBJS.ST.18.00113
16. Котельников Г.П., Кудашев Д.С., Ларцев Ю.В., и др. Оперативное лечение хондральных дефектов коленного сустава и новый взгляд на роль и место мозаичной аутохондропластики // *Наука и инновации в медицине*. (In Press). doi: 10.35693/SIM553365
17. Heir S., Årøen A., Løken S., et al. Cartilage repair in the rabbit knee: mosaic plasty resulted in higher degree of tissue filling but affected subchondral bone more than microfracture technique: a blinded, randomized, controlled, long-term follow-up trial in 88 knees // *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012. Vol. 20, N. 2. P. 197–209. doi: 10.1007/s00167-011-1596-8
18. Johnstone T., Shea K. ACL & MACI for the management of osteochondritis dissecans // *Oper Tech Sports Med*. 2023. Vol. 31, N. 2. P. 151008. doi: 10.1016/j.otism.2023.151008
19. Armiento A.R., Alini M., Stoddart M.J. Articular fibrocartilage — why does hyaline cartilage fail to repair? // *Adv Drug Deliv Rev*. 2019. Vol. 146. P. 289–305. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.015
20. Medellin M.R., Fujiwara T., Clark R., et al. Mechanisms of failure and survival of total femoral endoprosthetic replacements // *Bone Joint J*. 2019. Vol. 101-B, N. 5. P. 522–528. doi: 10.1302/0301-620X.101B5.BJJ-2018-1106.R1
21. Rodríguez-Merchán E.C. The stiff total knee arthroplasty: causes, treatment modalities and results // *EFORT Open Rev*. 2019. Vol. 4, N. 10. P. 602–610. doi: 10.1302/2058-5241.4.180105
22. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126, N. 4. P. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
23. Park I.H., Zhao R., West J.A., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors // *Nature*. 2008. Vol. 451, N. 7175. P. 141–146. doi: 10.1038/nature06534
24. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. Vol. 131, N. 5. P. 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
25. Scesa G., Adami R., Bottai D. iPSC preparation and epigenetic memory: does the tissue origin matter? // *Cells*. 2021. Vol. 10, N. 6. P. 1470. doi: 10.3390/cells10061470
26. Zahumenska R., Nosal V., Smolar M., et al. Induced pluripotency: a powerful tool for in vitro modeling // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N. 23. P. 8910. doi: 10.3390/ijms21238910

27. Sharma A., Sances S., Workman M.J., Svendsen C.N. Multi-lineage human iPSC-derived platforms for disease modeling and drug discovery // *Cell Stem Cell*. 2020. Vol. 26, N. 3. P. 309–329. doi: 10.1016/j.stem.2020.02.011
28. Park S., Gwon Y., Khan S.A., et al. Engineering considerations of iPSC-based personalized medicine // *Biomater Res*. 2023. Vol. 27, N. 1. P. 67. doi: 10.1186/s40824-023-00382-x
29. Kim J.Y., Nam Y., Rim Y.A., Ju J.H. Review of the current trends in clinical trials involving induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Rev Rep*. 2022. Vol. 18, N. 1. P. 142–154. doi: 10.1007/s12015-021-10262-3
30. Oldershaw R.A., Baxter M.A., Lowe E.T., et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes // *Nat Biotechnol*. 2010. Vol. 28, N. 11. P. 1187–1194. doi: 10.1038/nbt.1683
31. Qu C., Puttonen K.A., Lindeberg H., et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture // *Int J Biochem Cell Biol*. 2013. Vol. 45, N. 8. P. 1802–1812. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.029
32. De Kinderen P., Meester J., Loeys B., et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into chondrocytes: methods and applications for disease modeling and drug discovery // *J Bone Miner Res*. 2022. Vol. 37, N. 3. P. 397–410. doi: 10.1002/jbmr.4524
33. Van der Kraan P.M., Davidson E.N.B., Blom A., Van den Berg W.B. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads // *Osteoarthritis Cartilage*. 2009. Vol. 17, N. 12. P. 1539–1545. doi: 10.1016/j.joca.2009.06.008
34. Wang W., Rigueur D., Lyons K.M. TGFβ signaling in cartilage development and maintenance // *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2014. Vol. 102, N. 1. P. 37–51. doi: 10.1002/bdrc.21058
35. Du X., Cai L., Xie J., Zhou X. The role of TGF-beta3 in cartilage development and osteoarthritis // *Bone Res*. 2023. Vol. 11, N. 1. P. 2. doi: 10.1038/s41413-022-00239-4
36. Koyama N., Miura M., Nakao K., et al. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells // *Stem Cells Dev*. 2013. Vol. 22, N. 1. P. 102–113. doi: 10.1089/scd.2012.0127
37. Li Y., Liu T., Van Halm-Lutterodt N., et al. Reprogramming of blood cells into induced pluripotent stem cells as a new cell source for cartilage repair // *Stem Cell Res Ther*. 2016. Vol. 7. P. 31. doi: 10.1186/s13287-016-0290-7
38. Kawata M., Mori D., Kanke K., et al. Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds // *Stem Cell Reports*. 2019. Vol. 13, N. 3. P. 530–544. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.07.012
39. Cheng A., Kapacee Z., Peng J., et al. Cartilage repair using human embryonic stem cell-derived chondroprogenitors // *Stem Cells Transl Med*. 2014. Vol. 3, N. 11. P. 1287–1294. doi: 10.5966/sctm.2014-0101
40. Diederichs S., Klampfleuthner F.A.M., Moradi B., Richter W. Chondral differentiation of induced pluripotent stem cells without progression into the endochondral pathway // *Front Cell Dev Biol*. 2019. Vol. 7. P. 270. doi: 10.3389/fcell.2019.00270
41. Okutani Y., Abe K., Yamashita A., et al. Generation of monkey induced pluripotent stem cell-derived cartilage lacking major histocompatibility complex class I molecules on the cell surface // *Tissue Eng Part A*. 2022. Vol. 28, N. 1-2. P. 94–106. doi: 10.1089/ten.TEA.2021.0053
42. Craft A.M., Rockel J.S., Nartiss Y., et al. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells // *Nat Biotechnol*. 2015. Vol. 33, N. 6. P. 638–645. doi: 10.1038/nbt.3210
43. Lach M.S., Wroblewska J., Kulcenty K., et al. Chondrogenic differentiation of pluripotent stem cells under controllable serum-free conditions // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, N. 11. P. 2711. doi: 10.3390/ijms20112711
44. Prosser A., Scotchford C., Roberts G., et al. Integrated multi-assay culture model for stem cell chondrogenic differentiation // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, N. 4. P. 951. doi: 10.3390/ijms20040951
45. Caron M.M.J., Emans P.J., Coolsen M.M., et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures // *Osteoarthritis Cartilage*. 2012. Vol. 20, N. 10. P. 1170–1178. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.016
46. Hu X., Zhang W., Li X., et al. Strategies to modulate the redifferentiation of chondrocytes // *Front Bioeng Biotechnol*. 2021. Vol. 9. P. 764193. doi: 10.3389/fbioe.2021.764193
47. Yamashita A., Tsumaki N. Recent progress of animal transplantation studies for treating articular cartilage damage using pluripotent stem cells // *Dev Growth Differ*. 2021. Vol. 63, N. 1. P. 72–81. doi: 10.1111/dgd.12706
48. Chang Y.H., Wu K.C., Ding D.C. Induced pluripotent stem cell-differentiated chondrocytes repair cartilage defect in a rabbit osteoarthritis model // *Stem Cells Int*. 2020. Vol. 2020. P. 8867349. doi: 10.1155/2020/8867349
49. Abe K., Yamashita A., Morioka M., et al. Engraftment of allogeneic iPSC cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect // *Nat Commun*. 2023. Vol. 14, N. 1. P. 804. doi: 10.1038/s41467-023-36408-0
50. Arzi B., DuRaine G.D., Lee C.A., et al. Cartilage immunoprivilege depends on donor source and lesion location // *Acta Biomater*. 2015. Vol. 23. P. 72–81. doi: 10.1016/j.actbio.2015.05.025
51. Garrity C., Arzi B., Haus B., et al. A fresh glimpse into cartilage immune privilege // *Cartilage*. 2022. Vol. 13, N. 4. P. 119–132. doi: 10.1177/19476035221126349
52. Moskalewski S., Osiecka-Iwan A., Hyc A., Jozwiak J. Mechanical barrier as a protection against rejection of allogeneic cartilage formed in joint surface defects in rats // *Cell Transplant*. 2000. Vol. 9, N. 3. P. 349–357. doi: 10.1177/09636897000900306
53. Van der Kraan P.M. The interaction between joint inflammation and cartilage repair // *Tissue Eng Regen Med*. 2019. Vol. 16, N. 4. P. 327–334. doi: 10.1007/s13770-019-00204-z
54. Kim K., Doi A., Wen B., et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2010. Vol. 467, N. 7313. P. 285–290. doi: 10.1038/nature09342
55. Lister R., Pelizzola M., Kida Y.S., et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2011. Vol. 471, N. 7336. P. 68–73. doi: 10.1038/nature09798  
Erratum in: *Nature*. 2014. Vol. 514, N. 7520. P. 126.
56. Liu X., Li W., Fu X., Xu Y. The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives // *Front Immunol*. 2017. Vol. 8. P. 645. doi: 10.3389/fimmu.2017.00645
57. Garreta E., Sanchez S., Lajara J., et al. Roadblocks in the path of iPSC to the Clinic // *Curr Transplant Rep*. 2018. Vol. 5, N. 1. P. 14–18. doi: 10.1007/s40472-018-0177-x
58. Yoshihara M., Hayashizaki Y., Murakawa Y. Genomic instability of iPSCs: challenges towards their clinical applications // *Stem Cell Rev Rep*. 2017. Vol. 13, N. 1. P. 7–16. doi: 10.1007/s12015-016-9680-6

59. Kuang Y., Miki K., Parr C.J.C., et al. Efficient, selective removal of human pluripotent stem cells via ecto-alkaline phosphatase-mediated aggregation of synthetic peptides // *Cell Chem Biol*. 2017. Vol. 24, N. 6. P. 685–694. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.04.010
60. Nguyen T.D., Chooi W.H., Jeon H., et al. Label-free and high-throughput removal of residual undifferentiated cells from iPSC-derived spinal cord progenitor cells // *Stem Cells Transl Med*. 2024. Vol. 13, N. 4. P. 387–398. doi: 10.1093/stcltm/szae002
61. Chakraborty A.R., Vassilev A., Jaiswal S.K., et al. Selective elimination of pluripotent stem cells by PIKfyve specific inhibitors // *Stem Cell Reports*. 2022. Vol. 17, N. 2. P. 397–412. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.12.013
62. Takeda M., Ito E., Minami K., et al. Elimination of residual undifferentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) using irradiation for safe clinical applications of iPSC-derived cardiomyocytes // *Biochem Biophys Res Commun*. 2021. Vol. 574. P. 91–96. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.08.065
63. Zhao T., Zhang Z., Rong Z., Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells // *Nature*. 2011. Vol. 474, N. 7350. P. 212–215. doi: 10.1038/nature10135
64. Zhao T., Zhang Z., Westenskow P.D., et al. Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2015. Vol. 17, N. 3. P. 353–359. doi: 10.1016/j.stem.2015.07.021
65. Nakamura Y., Miyagawa S., Yoshida S., et al. Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, N. 1. P. 10840. doi: 10.1038/s41598-019-47134-3
66. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., et al. iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors // *Stem Cell Res Ther*. 2023. Vol. 14, N. 1. P. 77. doi: 10.1186/s13287-023-03308-5
67. Bogomiakova M.E., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. Dysregulation of immune tolerance to autologous iPSCs and their differentiated derivatives // *Biochemistry (Mosc)*. 2024. Vol. 89, N. 5. P. 799–816. doi: 10.1134/S0006297924050031
68. Sullivan S., Stacey G.N., Akazawa C., et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines // *Regen Med*. 2018. Vol. 13, N. 7. P. 859–866. doi: 10.2217/rme-2018-0095
69. Dashnau J.L., Xue Q., Nelson M., et al. A risk-based approach for cell line development, manufacturing and characterization of genetically engineered, induced pluripotent stem cell–derived allogeneic cell therapies // *Cytotherapy*. 2023. Vol. 25, N. 1. P. 1–13. doi: 10.1016/j.jcyt.2022.08.001
70. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases // *Genetics*. 2011. Vol. 188, N. 4. P. 773–782. doi: 10.1534/genetics.111.131433
71. Sanjana N.E., Cong L., Zhou Y., et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering // *Nat Protoc*. 2012. Vol. 7, N. 1. P. 171–192. doi: 10.1038/nprot.2011.431
72. Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems // *Nat Rev Microbiol*. 2011. Vol. 9, N. 6. P. 467–477. doi: 10.1038/nrmicro2577
73. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science*. 2012. Vol. 337, N. 6096. P. 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
74. Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. 2014. Vol. 346, N. 6213. P. 1258096. doi: 10.1126/science.1258096
75. Liu C., Zhang L., Liu H., Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications // *J Control Release*. 2017. Vol. 266. P. 17–26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.012
76. Khoshandam M., Soltaninejad H., Mousazadeh M., et al. Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine // *Genes Dis*. 2023. Vol. 11, N. 1. P. 268–282. doi: 10.1016/j.gendis.2023.02.027
77. Koike-Yusa H., Li Y., Tan EP., et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library // *Nat Biotechnol*. 2014. Vol. 32, N. 3. P. 267–273. doi: 10.1038/nbt.2800
78. Maggio I., Holkers M., Liu J., et al. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells // *Sci Rep*. 2014. Vol. 4. P. 5105. doi: 10.1038/srep05105
79. Shalem O., Sanjana N.E., Hartenian E., et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells // *Science*. 2014. Vol. 343, N. 6166. P. 84–87. doi: 10.1126/science.1247005
80. Knott G.J., Doudna J.A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering // *Science*. 2018. Vol. 361, N. 6405. P. 866–869. doi: 10.1126/science.aat5011
81. Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time // *Nat Biotechnol*. 2018. Vol. 36, N. 1. P. 6–7. doi: 10.1038/nbt0118-6b
82. Staahl B.T., Benekareddy M., Coulon-Bainier C., et al. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat Biotechnol*. 2017. Vol. 35, N. 5. P. 431–434. doi: 10.1038/nbt.3806
83. Zhang Y., Long C., Li H., et al. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice // *Sci Adv*. 2017. Vol. 3, N. 4. P. e1602814. doi: 10.1126/sciadv.1602814
84. Adkar S.S., Wu C.L., Willard V.P., et al. Step-wise chondrogenesis of human induced pluripotent stem cells and purification via a reporter allele generated by CRISPR-Cas9 genome editing // *Stem Cells*. 2019. Vol. 37, N. 1. P. 65–76. doi: 10.1002/stem.2931
85. Dicks A., Wu C.L., Steward N., et al. Prospective isolation of chondroprogenitors from human iPSCs based on cell surface markers identified using a CRISPR-Cas9-generated reporter // *Stem Cell Res Ther*. 2020. Vol. 11, N. 1. P. 66. doi: 10.1186/s13287-020-01597-8
86. Al-Maslamani N.A., Oldershaw R., Tew S., et al. Chondrocyte de-differentiation: Biophysical cues to nuclear alterations // *Cells*. 2022. Vol. 11, N. 24. P. 4011. doi: 10.3390/cells11244011
87. Hallett S.A., Ono W., Ono N. The hypertrophic chondrocyte: To be or not to be // *Histol Histopathol*. 2021. Vol. 36, N. 10. P. 1021–1036. doi: 10.14670/HH-18-355
88. Kamakura T., Jin Y., Nishio M., et al. Collagen X Is dispensable for hypertrophic differentiation and endochondral ossification of human iPSC derived chondrocytes // *JBMR Plus*. 2023. Vol. 7, N. 5. P. e10737. doi: 10.1002/jbm4.10737
89. Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage // *Orthod Craniofac Res*. 2005. Vol. 8, N. 1. P. 11–17. doi: 10.1111/j.1601-6343.2004.00308.x
90. Park S., Bello A., Arai Y., et al. Functional duality of chondrocyte hypertrophy and biomedical application trends in

- osteoarthritis // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, N. 8. P. 1139. doi: 10.3390/pharmaceutics13081139
91. Chen N., Wu R.W.H., Lam Y., et al. Hypertrophic chondrocytes at the junction of musculoskeletal structures // *Bone Rep*. 2023. Vol. 19. P. 101698. doi: 10.1016/j.bonr.2023.101698
92. Dicks A.R., MaksaeV G.I., Harissa Z., et al. Skeletal dysplasia-causing TRPV4 mutations suppress the hypertrophic differentiation of human iPSC-derived chondrocytes // *Elife*. 2023. Vol. 12. P. e71154. doi: 10.7554/eLife.71154
93. Krakow D., Rimoin D.L. The skeletal dysplasias // *Genet Med*. 2010. Vol. 12, N 6. P. 327–341. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181daae9b
94. Glass K.A., Link J.M., Brunger J.M., et al. Tissue-engineered cartilage with inducible and tunable immunomodulatory properties // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, N. 22. P. 5921–5931. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.073
95. Blasioli D.J., Matthews G.L., Kaplan D.L. The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, N. 4. P. 1185–1191. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.050
96. Willard V.P., Diekmann B.O., Sanchez-Adams J., et al. Use of cartilage derived from murine induced pluripotent stem cells for osteoarthritis drug screening // *Arthritis Rheumatol*. 2014. Vol. 66, N. 11. P. 3062–3072. doi: 10.1002/art.38780
97. Ramos-Casals M., Brito-Zerón P., Soto M.J., et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies // *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008. Vol. 22, N. 5. P. 847–861. doi: 10.1016/j.berh.2008.09.008
98. Brunger J.M., Zutshi A., Willard V.P., et al. CRISPR/Cas9 editing of murine induced pluripotent stem cells for engineering inflammation-resistant tissues // *Arthritis Rheumatol*. 2017. Vol. 69, N. 5. P. 1111–1121. doi: 10.1002/art.39982
99. Peng H., Tan L., Osaki M., et al. ESE-1 is a potent repressor of type II collagen gene (COL2A1) transcription in human chondrocytes // *J Cell Physiol*. 2008. Vol. 215, N. 2. P. 562–573. doi: 10.1002/jcp.21338
100. Heldens G.T.H., Blaney Davidson E.N., Vitters E.L., et al. Catabolic factors and osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells // *Tissue Eng Part A*. 2012. Vol. 18, N. 1–2. P. 45–54. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0083
101. Kapoor M., Martel-Pelletier J., Lajeunesse D., et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis // *Nat Rev Rheumatol*. 2011. Vol. 7, N. 1. P. 33–42. doi: 10.1038/nrrheum.2010.196
102. Li C., Chen S., Zhou Y., et al. Application of induced pluripotent stem cell transplants: Autologous or allogeneic? // *Life Sci*. 2018. Vol. 212. P. 145–149. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.057
103. Chhabra A. Derivation of human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and mechanism of pluripotency: historical perspective and recent advances // *Stem Cell Rev Rep*. 2017. Vol. 13, N. 6. P. 757–773. doi: 10.1007/s12015-017-9766-9
104. Fairchild P.J. The challenge of immunogenicity in the quest for induced pluripotency // *Nat Rev Immunol*. 2010. Vol. 10, N. 12. P. 868–875. doi: 10.1038/nri2878
105. Богомякова М.Е., Еремеев А.В., Лагарькова М.А. «Свой среди чужих»: можно ли создать гипоиммуногенные линии плюрипотентных стволовых клеток? // *Молекулярная биология*. 2019. Т. 53, № 5. P. 725–740. EDN: ODQOJP doi: 10.1134/S0026898419050045
106. Blume O.R., Yost S.E., Kaplan B. Antibody-mediated rejection: pathogenesis, prevention, treatment, and outcomes // *J Transplant*. 2012. Vol. 2012. P. 201754. doi: 10.1155/2012/201754
107. Ayala García M.A., González Yebra B., López Flores A.L., Guaní Guerra E. The major histocompatibility complex in transplantation // *J Transplant*. 2012. Vol. 2012. P. 842141. doi: 10.1155/2012/842141
108. Yoshida S., Kato T.M., Sato Y., et al. A clinical-grade HLA haplobank of human induced pluripotent stem cells matching approximately 40% of the Japanese population // *Med*. 2023. Vol. 4, N. 1. P. 51–66. doi: 10.1016/j.medj.2022.10.003
109. Okita K., Matsumura Y., Sato Y., et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSCs // *Nat Methods*. 2011. Vol. 8, N. 5. P. 409–412. doi: 10.1038/nmeth.1591
110. Pappas D.J., Gourraud P.A., Le Gall C., et al. Proceedings: human leukocyte antigen haplo-homozygous induced pluripotent stem cell haplobank modeled after the California population: evaluating matching in a multiethnic and admixed population // *Stem Cells Transl Med*. 2015. Vol. 4, N. 5. P. 413–418. doi: 10.5966/sctm.2015-0052
111. Taylor C.J., Peacock S., Chaudhry A.N., et al. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 11, N. 2. P. 147–152. doi: 10.1016/j.stem.2012.07.014
112. Горин И.О., Петрушенко В.С., Записецкая Ю.С., и др. Применение популяционного биобанка для анализа частот клинически значимых ДНК-маркеров у населения России: биоинформатические аспекты // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020. Т. 19, № 6. P. 168–178. EDN: LGGORO doi: 10.15829/1728-8800-2020-2732
113. Хамаганова Е.Г., Леонов Е.А., Абдрахимова А.Р., и др. HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения // *Медицинская иммунология*. 2021. Т. 23, № 3. P. 509–522. EDN: TRNANW doi: 10.15789/1563-0625-HDI-2182
114. Jang Y., Choi J., Park N., et al. Development of immunocompatible pluripotent stem cells via CRISPR-based human leukocyte antigen engineering // *Exp Mol Med*. 2019. Vol. 51, N. 1. P. 1–11. doi: 10.1038/s12276-018-0190-2
115. Osiecka-Iwan A., Hyc A., Radomska-Leśniewska D.M., et al. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases // *Cent Eur J Immunol*. 2018. Vol. 43, N. 2. P. 209–219. doi: 10.5114/cej.2018.77392
116. Adkisson H.D., Milliman C., Zhang X., et al. Immune evasion by neocartilage-derived chondrocytes: Implications for biologic repair of joint articular cartilage // *Stem Cell Res*. 2010. Vol. 4, N. 1. P. 57–68. doi: 10.1016/j.scr.2009.09.004
117. Carreno B.M., Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses // *Annu Rev Immunol*. 2002. Vol. 20. P. 29–53. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806
118. Lance E.M., Kimura L.H., Manibog C.N. The expression of major histocompatibility antigens on human articular chondrocytes // *Clin Orthop Relat Res*. 1993. Vol. 291. P. 266–282.
119. Lim C.L., Lee Y.J., Cho J.H., et al. Immunogenicity and immunomodulatory effects of the human chondrocytes, hChonJ // *BMC Musculoskelet Disord*. 2017. Vol. 18, N. 1. P. 199. doi: 10.1186/s12891-017-1547-8

- 120.** Huey D.J., Sanchez-Adams J., Willard V.P., Athanasiou K.A. Immunogenicity of bovine and leporine articular chondrocytes and meniscus cells // *Tissue Eng Part A*. 2012. Vol. 18, N. 5-6. P. 568–575. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0226
- 121.** Thongsin N., Suwanpitak S., Wattanapanitch M. CRISPR-Cas9-mediated disruption of B2M and CIITA genes eliminates HLA class I and II expression in human induced pluripotent stem cells (MUSli001-A-2) // *Stem Cell Res*. 2023. Vol. 71. P. 103138. doi: 10.1016/j.scr.2023.103138
- 122.** Thongsin N., Wattanapanitch M. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complex-mediated efficient B2M knockout in human induced pluripotent stem cells (iPSCs) // *Methods Mol Biol*. 2022. Vol. 2454. P. 607–624. doi: 10.1007/7651\_2021\_352
- 123.** Koga K., Wang B., Kaneko S. Current status and future perspectives of HLA-edited induced pluripotent stem cells // *Inflamm Regen*. 2020. Vol. 40. P. 23. doi: 10.1186/s41232-020-00132-9
- 124.** Masuda K., Kawamoto H. Possible NK cell-mediated immune responses against iPSC-derived cells in allogeneic transplantation settings // *Inflamm Regen*. 2021. Vol. 41, N. 1. P. 2. doi: 10.1186/s41232-020-00150-7
- 125.** Moesta A.K., Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3 // *Front Immunol*. 2012. Vol. 3. P. 336. doi: 10.3389/fimmu.2012.00336
- 126.** Joncker N.T., Raullet D.H. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells // *Immunol Rev*. 2008. Vol. 224. P. 85–97. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00658.x
- 127.** Xu H., Wang B.O., Ono M., et al. Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility // *Cell Stem Cell*. 2019. Vol. 24, N. 4. P. 566–578. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.005
- 128.** Deuse T., Hu X., Gravina A., et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients // *Nat Biotechnol*. 2019. Vol. 37, N. 3. P. 252–258. doi: 10.1038/s41587-022-01426-8
- Erratum for: *Nat Biotechnol*. 2019. Vol. 37, N. 3. P. 252–258. doi: 10.1038/s41587-019-0016-3
- 129.** Romano E., Trionfini P., Giampietro R., et al. Generation of a homozygous CIITA knockout iPSC cell line using the CRISPR-Cas9 system // *Stem Cell Res*. 2021. Vol. 57. P. 102580. doi: 10.1016/j.scr.2021.102580
- 130.** Hu X., White K., Olroyd A.G., et al. Hypoimmune induced pluripotent stem cells survive long term in fully immunocompetent, allogeneic rhesus macaques // *Nat Biotechnol*. 2024. Vol. 42, N. 3. P. 413–423. doi: 10.1038/s41587-023-01784-x
- 131.** Simkin D., Papakis V., Bustos B.I., et al. Homozygous might be hemizygous: CRISPR/Cas9 editing in iPSCs results in detrimental on-target defects that escape standard quality controls // *Stem Cell Reports*. 2022. Vol. 17, N. 4. P. 993–1008. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.02.008
- 132.** Adikusuma F., Piltz S., Corbett M.A., et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage // *Nature*. 2018. Vol. 560, N. 7717. P. E8–E9. doi: 10.1038/s41586-018-0380-z
- 133.** Leibowitz M.L., Papathanasiou S., Doerfler P.A., et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing // *Nat Genet*. 2021. Vol. 53, N. 6. P. 895–905. doi: 10.1038/s41588-021-00838-7
- 134.** Fu Y., Foden J.A., Khayter C., et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // *Nat Biotechnol*. 2013. Vol. 31, N. 9. P. 822–826. doi: 10.1038/nbt.2623
- 135.** Yang Z.X., Deng D.H., Gao Z.Y., et al. OliTag-seq enhances in cellulo detection of CRISPR-Cas9 off-targets // *Commun Biol*. 2024. Vol. 7, N. 1. P. 696. doi: 10.1038/s42003-024-06360-w
- 136.** Weisheit I., Kroeger J.A., Malik R., et al. Simple and reliable detection of CRISPR-induced on-target effects by qPCR and SNP genotyping // *Nat Protoc*. 2021. Vol. 16, N. 3. P. 1714–1739. doi: 10.1038/s41596-020-00481-2
- 137.** Zhu W., Li M., Wu Y., Hu B. Precise immune tolerance for hPSC derivatives in clinical application // *Cell Immunol*. 2018. Vol. 326. P. 15–23. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.08.005

## REFERENCES

- 1.** Kheir E, Shaw D. Hyaline cular cartilage. *Orthop Trauma*. 2009;23(6):450–455. doi: 10.1016/j.mporth.2009.01.003
- 2.** Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull*. 2008;87:77–95. doi: 10.1093/bmb/ldn025
- 3.** Swieszkowski W, Tuan BHS, Kurzydowski KJ, Hutmacher DW. Repair and regeneration of osteochondral defects in the articular joints. *Biomol Eng*. 2007;24(5):489–495. doi: 10.1016/j.bioeng.2007.07.014
- 4.** Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(402):21–37. doi: 10.1097/00003086-200209000-00004
- 5.** Giorgino R, Albano D, Fusco S, et al. Knee osteoarthritis: epidemiology, pathogenesis, and mesenchymal stem cells: what else is new? An update. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6405. doi: 10.3390/ijms24076405
- 6.** Steinmetz JD, Culbreth GT, Haile LM, et al. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol*. 2023;5(9):e508–e522. doi: 10.1016/S2665-9913(23)00163-7
- 7.** Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(2):184–195. doi: 10.1016/j.joca.2021.04.020
- 8.** Muthu S, Korpershoek JV, Novais EJ, et al. Failure of cartilage regeneration: emerging hypotheses and related therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2023;19(7):403–416. doi: 10.1038/s41584-023-00979-5
- 9.** Nam Y, Rim YA, Lee J, Ju JH. Current therapeutic strategies for stem cell-based cartilage regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;2018:8490489. doi: 10.1155/2018/8490489
- 10.** Lach MS, Rosochowicz MA, Richter M, et al. The induced pluripotent stem cells in articular cartilage regeneration and disease modelling: are we ready for their clinical use? *Cells*. 2022;11(3):529. doi: 10.3390/cells11030529
- 11.** Medvedeva EV, Grebenik EA, Gornostaeva SN, et al. Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8):2366. doi: 10.3390/ijms19082366
- 12.** Schrock JB, Kraeutler MJ, Houck DA, et al. A cost-effectiveness analysis of surgical treatment modalities for chondral lesions of

- the knee: microfracture, osteochondral autograft transplantation, and autologous chondrocyte implantation. *Orthop J Sports Med.* 2017;5(5):2325967117704634. doi: 10.1177/2325967117704634
13. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(11):1119–1125. doi: 10.1016/j.joca.2006.05.003
14. Muthu S, Viswanathan VK, Sakthivel M, Thabrez M. Does progress in microfracture techniques necessarily translate into clinical effectiveness? *World J Orthop.* 2024;15(3):266–284. doi: 10.5312/wjo.v15.i3.266
15. Inderhaug E, Solheim E. Osteochondral autograft transplant (mosaicplasty) for knee articular cartilage defects. *JBJS Essent Surg Tech.* 2019;9(4):e34.1–e34.2. doi: 10.2106%2FJBJS.ST.18.00113
16. Kotelnikov GP, Kudashev DS, Lartsev YuV, et al. Surgical treatment of the knee joint for chondral defects and a new approach to the role and place of mosaic autochondroplasty. *Science & Innovations in Medicine.* (In Russ.) (In press). doi: 10.35693/SIM553365
17. Heir S, Årøen A, Løken S, et al. Cartilage repair in the rabbit knee: mosaic plasty resulted in higher degree of tissue filling but affected subchondral bone more than microfracture technique: a blinded, randomized, controlled, long-term follow-up trial in 88 knees. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(2):197–209. doi: 10.1007/s00167-011-1596-8
18. Johnstone T, Shea K. ACL & MACI for the management of osteochondritis dissecans. *Oper Tech Sports Med.* 2023;31(2):151008. doi: 10.1016/j.otsm.2023.151008
19. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ. Articular fibrocartilage — why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;146:289–305. doi: 10.1016/j.addr.2018.12.015
20. Medellin MR, Fujiwara T, Clark R, et al. Mechanisms of failure and survival of total femoral endoprosthesis replacements. *Bone Joint J.* 2019;101-B(5):522–528. doi: 10.1302/0301-620X.101B5.BJJ-2018-1106.R1
21. Rodríguez-Merchán EC. The stiff total knee arthroplasty: causes, treatment modalities and results. *EFORT Open Rev.* 2019;4(10):602–610. doi: 10.1302/2058-5241.4.180105
22. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
23. Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008;451(7175):141–146. doi: 10.1038/nature06534
24. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
25. Scesa G, Adami R, Bottai D. iPSC preparation and epigenetic memory: does the tissue origin matter? *Cells.* 2021;10(6):1470. doi: 10.3390/cells10061470
26. Zahumenska R, Nosal V, Smolar M, et al. Induced pluripotency: a powerful tool for in vitro modeling. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):8910. doi: 10.3390/ijms21238910
27. Sharma A, Sances S, Workman MJ, Svendsen CN. Multi-lineage human iPSC-derived platforms for disease modeling and drug discovery. *Cell Stem Cell.* 2020;26(3):309–329. doi: 10.1016/j.stem.2020.02.011
28. Park S, Gwon Y, Khan SA, et al. Engineering considerations of iPSC-based personalized medicine. *Biomater Res.* 2023;27(1):67. doi: 10.1186/s40824-023-00382-x
29. Kim JY, Nam Y, Rim YA, Ju JH. Review of the current trends in clinical trials involving induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2022;18(1):142–154. doi: 10.1007/s12015-021-10262-3
30. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol.* 2010;28(11):1187–1194. doi: 10.1038/nbt.1683
31. Qu C, Puttonen KA, Lindeberg H, et al. Chondrogenic differentiation of human pluripotent stem cells in chondrocyte co-culture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(8):1802–1812. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.029
32. De Kinderen P, Meester J, Loeys B, et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into chondrocytes: methods and applications for disease modeling and drug discovery. *J Bone Miner Res.* 2022;37(3):397–410. doi: 10.1002/jbmr.4524
33. Van der Kraan PM, Davidson ENB, Blom A, Van den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009;17(12):1539–1545. doi: 10.1016/j.joca.2009.06.008
34. Wang W, Rigueur D, Lyons KM. TGFβ signaling in cartilage development and maintenance. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(1):37–51. doi: 10.1002/bdrc.21058
35. Du X, Cai L, Xie J, Zhou X. The role of TGF-beta3 in cartilage development and osteoarthritis. *Bone Res.* 2023;11(1):2. doi: 10.1038/s41413-022-00239-4
36. Koyama N, Miura M, Nakao K, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiated into chondrogenic lineage via generation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(1):102–113. doi: 10.1089/scd.2012.0127
37. Li Y, Liu T, Van Halm-Lutterodt N, et al. Reprogramming of blood cells into induced pluripotent stem cells as a new cell source for cartilage repair. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7:31. doi: 10.1186/s13287-016-0290-7
38. Kawata M, Mori D, Kanke K, et al. Simple and robust differentiation of human pluripotent stem cells toward chondrocytes by two small-molecule compounds. *Stem Cell Reports.* 2019;13(3):530–544. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.07.012
39. Cheng A, Kapacee Z, Peng J, et al. Cartilage repair using human embryonic stem cell-derived chondroprogenitors. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(11):1287–1294. doi: 10.5966/sctm.2014-0101
40. Diederichs S, Klampfleuthner FAM, Moradi B, Richter W. Chondral differentiation of induced pluripotent stem cells without progression into the endochondral pathway. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:270. doi: 10.3389/fcell.2019.00270
41. Okutani Y, Abe K, Yamashita A, et al. Generation of monkey induced pluripotent stem cell-derived cartilage lacking major histocompatibility complex class I molecules on the cell surface. *Tissue Eng Part A.* 2022;28(1-2):94–106. doi: 10.1089/ten.TEA.2021.0053
42. Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, et al. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2015;33(6):638–645. doi: 10.1038/nbt.3210
43. Lach MS, Wroblewska J, Kulcenty K, et al. Chondrogenic differentiation of pluripotent stem cells under controllable serum-free conditions. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2711. doi: 10.3390/ijms20112711

44. Prosser A, Scotchford C, Roberts G, et al. Integrated multi-assay culture model for stem cell chondrogenic differentiation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4):951. doi: 10.3390/ijms20040951
45. Caron MMJ, Emans PJ, Coolsen MME, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(10):1170–1178. doi: 10.1016/j.joca.2012.06.016
46. Hu X, Zhang W, Li X, et al. Strategies to modulate the redifferentiation of chondrocytes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:764193. doi: 10.3389/fbioe.2021.764193
47. Yamashita A, Tsumaki N. Recent progress of animal transplantation studies for treating articular cartilage damage using pluripotent stem cells. *Dev Growth Differ*. 2021;63(1):72–81. doi: 10.1111/dgd.12706
48. Chang YH, Wu KC, Ding DC. Induced pluripotent stem cell-differentiated chondrocytes repair cartilage defect in a rabbit osteoarthritis model. *Stem Cells Int*. 2020;2020:8867349. doi: 10.1155/2020/8867349
49. Abe K, Yamashita A, Morioka M, et al. Engraftment of allogeneic iPSC cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nat Commun*. 2023;14(1):804. doi: 10.1038/s41467-023-36408-0
50. Arzi B, DuRaine GD, Lee CA, et al. Cartilage immunoprivilege depends on donor source and lesion location. *Acta Biomater*. 2015;23:72–81. doi: 10.1016/j.actbio.2015.05.025
51. Garrity C, Arzi B, Haus B, et al. A fresh glimpse into cartilage immune privilege. *Cartilage*. 2022;13(4):119–132. doi: 10.1177/19476035221126349
52. Moskalewski S, Osiecka-Iwan A, Hyc A, Jozwiak J. Mechanical barrier as a protection against rejection of allogeneic cartilage formed in joint surface defects in rats. *Cell Transplant*. 2000;9(3):349–357. doi: 10.1177/09636897000900306
53. Van der Kraan PM. The interaction between joint inflammation and cartilage repair. *Tissue Eng Regen Med*. 2019;16(4):327–334. doi: 10.1007/s13770-019-00204-z
54. Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010;467(7313):285–290. doi: 10.1038/nature09342
55. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:68–73. doi: 10.1038/nature09798 Erratum in: *Nature*. 2014;514(7520):126.
56. Liu X, Li W, Fu X, Xu Y. The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives. *Front Immunol*. 2017;8:645. doi: 10.3389/fimmu.2017.00645
57. Garreta E, Sanchez S, Lajara J, et al. Roadblocks in the Path of iPSC to the Clinic. *Curr Transplant Rep*. 2018;5(1):14–18. doi: 10.1007/s40472-018-0177-x
58. Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic instability of iPSCs: challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2017;13(1):7–16. doi: 10.1007/s12015-016-9680-6
59. Kuang Y, Miki K, Parr CJC, et al. Efficient, selective removal of human pluripotent stem cells via ecto-alkaline phosphatase-mediated aggregation of synthetic peptides. *Cell Chem Biol*. 2017;24(6):685–694.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.04.010
60. Nguyen TD, Chooi WH, Jeon H, et al. Label-free and high-throughput removal of residual undifferentiated cells from iPSC-derived spinal cord progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*. 2024;13(4):387–398. doi: 10.1093/stcltm/szae002
61. Chakraborty AR, Vassilev A, Jaiswal SK, et al. Selective elimination of pluripotent stem cells by PIKfyve specific inhibitors. *Stem Cell Reports*. 2022;17(2):397–412. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.12.013
62. Takeda M, Ito E, Minami K, et al. Elimination of residual undifferentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) using irradiation for safe clinical applications of iPSC-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;574:91–96. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.08.065
63. Zhao T, Zhang Z, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212–215. doi: 10.1038/nature10135
64. Zhao T, Zhang Z, Westenskow PD, et al. Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):353–359. doi: 10.1016/j.stem.2015.07.021
65. Nakamura Y, Miyagawa S, Yoshida S, et al. Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model. *Sci Rep*. 2019;9(1):10840. doi: 10.1038/s41598-019-47134-3
66. Bogomiakova ME, Sekretova EK, Anufrieva KS, et al. iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):77. doi: 10.1186/s13287-023-03308-5
67. Bogomiakova ME, Bogomazova AN, Lagarkova MA. Dysregulation of immune tolerance to autologous iPSCs and their differentiated derivatives. *Biochemistry (Mosc)*. 2024;89(5):799–816. doi: 10.1134/S0006297924050031
68. Sullivan S, Stacey GN, Akazawa C, et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen Med*. 2018;13(7):859–866. doi: 10.2217/rme-2018-0095
69. Dashnau JL, Xue Q, Nelson M, et al. A risk-based approach for cell line development, manufacturing and characterization of genetically engineered, induced pluripotent stem cell-derived allogeneic cell therapies. *Cytotherapy*. 2023;25(1):1–13. doi: 10.1016/j.jcyt.2022.08.001
70. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*. 2011;188(4):773–782. doi: 10.1534/genetics.111.131433
71. Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc*. 2012;7(1):171–192. doi: 10.1038/nprot.2011.431
72. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(6):467–477. doi: 10.1038/nrmicro2577
73. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816–821. doi: 10.1126/science.1225829
74. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096
75. Liu C, Zhang L, Liu H, Cheng K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release*. 2017;266:17–26. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.012
76. Khoshandam M, Soltaninejad H, Mousazadeh M, et al. Clinical applications of the CRISPR/Cas9 genome-editing system: Delivery options and challenges in precision medicine. *Genes Dis*. 2023;11(1):268–282. doi: 10.1016/j.gendis.2023.02.027

- 77.** Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol.* 2014;32(3):267–273. doi: 10.1038/nbt.2800
- 78.** Maggio I, Holkers M, Liu J, et al. Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep.* 2014;4:5105. doi: 10.1038/srep05105
- 79.** Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014;343(6166):84–87. doi: 10.1126/science.1247005
- 80.** Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science.* 2018;361(6405):866–869. doi: 10.1126/science.aat5011
- 81.** Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat Biotechnol.* 2018;36(1):6–7. doi: 10.1038/nbt0118-6b
- 82.** Staahl BT, Benekareddy M, Coulon-Bainier C, et al. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Biotechnol.* 2017;35(5):431–434. doi: 10.1038/nbt.3806
- 83.** Zhang Y, Long C, Li H, et al. CRISPR-Cpf1 correction of muscular dystrophy mutations in human cardiomyocytes and mice. *Sci Adv.* 2017;3(4):e1602814. doi: 10.1126/sciadv.1602814
- 84.** Adkar SS, Wu CL, Willard VP, et al. Step-wise chondrogenesis of human induced pluripotent stem cells and purification via a reporter allele generated by CRISPR-Cas9 genome editing. *Stem Cells.* 2019;37(1):65–76. doi: 10.1002/stem.2931
- 85.** Dicks A, Wu CL, Steward N, et al. Prospective isolation of chondroprogenitors from human iPSCs based on cell surface markers identified using a CRISPR-Cas9-generated reporter. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):66. doi: 10.1186/s13287-020-01597-8
- 86.** Al-Maslamani NA, Oldershaw R, Tew S, et al. Chondrocyte de-differentiation: Biophysical cues to nuclear alterations. *Cells.* 2022;11(24):4011. doi: 10.3390/cells11244011
- 87.** Hallett SA, Ono W, Ono N. The hypertrophic chondrocyte: To be or not to be. *Histol Histopathol.* 2021;36(10):1021–1036. doi: 10.14670/HH-18-355
- 88.** Kamakura T, Jin Y, Nishio M, et al. Collagen X is dispensable for hypertrophic differentiation and endochondral ossification of human iPSC derived chondrocytes. *JBMR Plus.* 2023;7(5):e10737. doi: 10.1002/jbm4.10737
- 89.** Shen G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(1):11–17. doi: 10.1111/j.1601-6343.2004.00308.x
- 90.** Park S, Bello A, Arai Y, et al. Functional duality of chondrocyte hypertrophy and biomedical application trends in osteoarthritis. *Pharmaceutics.* 2021;13(8):1139. doi: 10.3390/pharmaceutics13081139
- 91.** Chen N, Wu RWH, Lam Y, et al. Hypertrophic chondrocytes at the junction of musculoskeletal structures. *Bone Rep.* 2023;19:101698. doi: 10.1016/j.bonr.2023.101698
- 92.** Dicks AR, Makshev GI, Harissa Z, et al. Skeletal dysplasia-causing TRPV4 mutations suppress the hypertrophic differentiation of human iPSC-derived chondrocytes. *Elife.* 2023;12:e71154. doi: 10.7554/eLife.71154
- 93.** Krakow D, Rimoin DL. The skeletal dysplasias. *Genet Med.* 2010;12(6):327–341. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181daae9b
- 94.** Glass KA, Link JM, Brunger JM, et al. Tissue-engineered cartilage with inducible and tunable immunomodulatory properties. *Biomaterials.* 2014;35(22):5921–5931. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.073
- 95.** Blasioli DJ, Matthews GL, Kaplan DL. The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells. *Biomaterials.* 2014;35(4):1185–1191. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.050
- 96.** Willard VP, Diekmann BO, Sanchez-Adams J, et al. Use of cartilage derived from murine induced pluripotent stem cells for osteoarthritis drug screening. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(11):3062–3072. doi: 10.1002/art.38780
- 97.** Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Soto MJ, et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(5):847–861. doi: 10.1016/j.berh.2008.09.008
- 98.** Brunger JM, Zutshi A, Willard VP, et al. CRISPR/Cas9 editing of murine induced pluripotent stem cells for engineering inflammation-resistant tissues. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(5):1111–1121. doi: 10.1002/art.39982
- 99.** Peng H, Tan L, Osaki M, et al. ESE-1 is a potent repressor of type II collagen gene (COL2A1) transcription in human chondrocytes. *J Cell Physiol.* 2008;215(2):562–573. doi: 10.1002/jcp.21338
- 100.** Heldens GTH, Blaney Davidson EN, Vitters EL, et al. Catabolic factors and osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(1-2):45–54. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0083
- 101.** Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):33–42. doi: 10.1038/nrrheum.2010.196
- 102.** Li C, Chen S, Zhou Y, et al. Application of induced pluripotent stem cell transplants: Autologous or allogeneic? *Life Sci.* 2018;212:145–149. doi: 10.1016/j.lfs.2018.09.057
- 103.** Chhabra A. Derivation of human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and mechanism of pluripotency: historical perspective and recent advances. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(6):757–773. doi: 10.1007/s12015-017-9766-9
- 104.** Fairchild PJ. The challenge of immunogenicity in the quest for induced pluripotency. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):868–875. doi: 10.1038/nri2878
- 105.** Bogomiakova ME, Ereemeev AV, Lagarkova MA. At home among strangers: is it possible to create hypoimmunogenic pluripotent stem cell lines? *Molecular Biology.* 2019;53(5):638–652. (In Russ.) EDN: TZNNEO doi: 10.1134/S0026893319050042
- 106.** Blume OR, Yost SE, Kaplan B. Antibody-mediated rejection: pathogenesis, prevention, treatment, and outcomes. *J Transplant.* 2012;2012:201754. doi: 10.1155/2012/201754
- 107.** Ayala García MA, González Yebra B, López Flores AL, Guaní Guerra E. The major histocompatibility complex in transplantation. *J Transplant.* 2012;2012:842141. doi: 10.1155/2012/842141
- 108.** Yoshida S, Kato TM, Sato Y, et al. A clinical-grade HLA haplobank of human induced pluripotent stem cells matching approximately 40% of the Japanese population. *Med.* 2023;4(1):51–66.e10. doi: 10.1016/j.medj.2022.10.003
- 109.** Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPSC cells. *Nat Methods.* 2011;8(5):409–412. doi: 10.1038/nmeth.1591
- 110.** Pappas DJ, Gourraud PA, Le Gall C, et al. Proceedings: human leukocyte antigen haplo-homozygous induced pluripotent stem cell haplobank modeled after the California population: evaluating

- matching in a multiethnic and admixed population. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(5):413–418. doi: 10.5966/sctm.2015-0052
- 111.** Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, et al. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell.* 2012;11(2):147–152. doi: 10.1016/j.stem.2012.07.014
- 112.** Gorin IO, Petrusenko VS, Zapisetskaya YuS, et al. Population-based biobank for analyzing the frequencies of clinically relevant DNA markers in the Russian population: bioinformatic aspects. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 2020;19(6):168–178. EDN: LLGORO doi: 10.15829/1728-8800-2020-2732
- 113.** Khamaganova EG, Leonov EA, Abdrakhimova AR, et al. HLA diversity in the Russian population assessed by next generation sequencing. *Medicinskaja immunologija.* 2021;23(3):509–522. EDN: TRNANW doi: 10.15789/1563-0625-HDI-2182
- 114.** Jang Y, Choi J, Park N, et al. Development of immunocompatible pluripotent stem cells via CRISPR-based human leukocyte antigen engineering. *Exp Mol Med.* 2019;51(1):1–11. doi: 10.1038/s12276-018-0190-2
- 115.** Osiecka-Iwan A, Hyc A, Radomska-Leśniewska DM, et al. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. *Cent Eur J Immunol.* 2018;43(2):209–219. doi: 10.5114/ceji.2018.77392
- 116.** Adkisson HD, Milliman C, Zhang X, et al. Immune evasion by neocartilage-derived chondrocytes: Implications for biologic repair of joint articular cartilage. *Stem Cell Res.* 2010;4(1):57–68. doi: 10.1016/j.scr.2009.09.004
- 117.** Carreno BM, Collins M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:29–53. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.091101.091806
- 118.** Lance EM, Kimura LH, Manibog CN. The expression of major histocompatibility antigens on human articular chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 1993;(291):266–282.
- 119.** Lim CL, Lee YJ, Cho JH, et al. Immunogenicity and immunomodulatory effects of the human chondrocytes, hChonJ. *BMC Musculoskelet Disord.* 2017;18(1):199. doi: 10.1186/s12891-017-1547-8
- 120.** Huey DJ, Sanchez-Adams J, Willard VP, Athanasiou KA. Immunogenicity of bovine and leporine articular chondrocytes and meniscus cells. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(5-6):568–575. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0226
- 121.** Thongsin N, Suwanpitak S, Wattanapanitch M. CRISPR-Cas9-mediated disruption of B2M and CIITA genes eliminates HLA class I and II expression in human induced pluripotent stem cells (MUSLi001-A-2). *Stem Cell Res.* 2023;71:103138. doi: 10.1016/j.scr.2023.103138
- 122.** Thongsin N, Wattanapanitch M. CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complex-mediated efficient B2M knockout in human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Methods Mol Biol.* 2022;2454:607–624. doi: 10.1007/7651\_2021\_352
- 123.** Koga K, Wang B, Kaneko S. Current status and future perspectives of HLA-edited induced pluripotent stem cells. *Inflamm Regen.* 2020;40:23. doi: 10.1186/s41232-020-00132-9
- 124.** Masuda K, Kawamoto H. Possible NK cell-mediated immune responses against iPSC-derived cells in allogeneic transplantation settings. *Inflamm Regen.* 2021;41(1):2. doi: 10.1186/s41232-020-00150-7
- 125.** Moesta AK, Parham P. Diverse functionality among human NK cell receptors for the C1 epitope of HLA-C: KIR2DS2, KIR2DL2, and KIR2DL3. *Front Immunol.* 2012;3:336. doi: 10.3389/fimmu.2012.00336
- 126.** Joncker NT, Raulet DH. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunol Rev.* 2008;224:85–97. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00658.x
- 127.** Xu H, Wang BO, Ono M, et al. Targeted disruption of HLA genes via CRISPR-Cas9 generates iPSCs with enhanced immune compatibility. *Cell Stem Cell.* 2019;24(4):566–578.e7. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.005
- 128.** Deuse T, Hu X, Gravina A, et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol.* 2019;37(3):252–258. doi: 10.1038/s41587-022-01426-8 Erratum for: *Nat Biotechnol.* 2019;37(3):252–258. doi: 10.1038/s41587-019-0016-3
- 129.** Romano E, Trionfini P, Giampietro R, et al. Generation of a homozygous CIITA knockout iPSC cell line using the CRISPR-Cas9 system. *Stem Cell Res.* 2021;57:102580. doi: 10.1016/j.scr.2021.102580
- 130.** Hu X, White K, Olroyd AG, et al. Hypoimmune induced pluripotent stem cells survive long term in fully immunocompetent, allogeneic rhesus macaques. *Nat Biotechnol.* 2024;42(3):413–423. doi: 10.1038/s41587-023-01784-x
- 131.** Simkin D, Papakis V, Bustos BI, et al. Homozygous might be hemizygous: CRISPR/Cas9 editing in iPSCs results in detrimental on-target defects that escape standard quality controls. *Stem Cell Reports.* 2022;17(4):993–1008. doi: 10.1016/j.stemcr.2022.02.008
- 132.** Adikusuma F, Piltz S, Corbett MA, et al. Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature.* 2018;560(7717):E8–E9. doi: 10.1038/s41586-018-0380-z
- 133.** Leibowitz ML, Papathanasiou S, Doerfler PA, et al. Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Genet.* 2021;53(6):895–905. doi: 10.1038/s41588-021-00838-7
- 134.** Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):822–826. doi: 10.1038/nbt.2623
- 135.** Yang ZX, Deng DH, Gao ZY, et al. OliTag-seq enhances in cellulo detection of CRISPR-Cas9 off-targets. *Commun Biol.* 2024;7(1):696. doi: 10.1038/s42003-024-06360-w
- 136.** Weisheit I, Kroeger JA, Malik R, et al. Simple and reliable detection of CRISPR-induced on-target effects by qPCR and SNP genotyping. *Nat Protoc.* 2021;16(3):1714–1739. doi: 10.1038/s41596-020-00481-2
- 137.** Zhu W, Li M, Wu Y, Hu B. Precise immune tolerance for hPSC derivatives in clinical application. *Cell Immunol.* 2018;326:15–23. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.08.005

## ОБ АВТОРАХ

\* **Игнатьева Надежда Владимировна**, канд. биол. наук;  
адрес: Россия, 119048, Москва, ул. Трубетцкая, д. 8, стр. 2;  
ORCID: 0009-0008-4421-0495;  
eLibrary SPIN: 9964-2485;  
e-mail: ignateva\_n\_v\_1@staff.sechenov.ru

**Гаврилов Никита Сергеевич**;  
ORCID: 0009-0008-3062-5251;  
e-mail: gavrilovns2001@mail.ru

**Медведева Екатерина Валерьевна**, канд. биол. наук;  
ORCID: 0000-0002-6263-0986;  
eLibrary SPIN: 1413-5899;  
e-mail: medvedevaekaterina@yandex.ru

**Тимашев Петр Сергеевич**, д-р хим. наук, доцент;  
ORCID: 0000-0001-7773-2435;  
eLibrary SPIN: 4836-2560;  
e-mail: timashev\_p\_s@staff.sechenov.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

\* **Nadezda V. Ignatyeva**, Cand. Sci. (Biology);  
address: 8 bldg. 2 Trubetskaya street, 119048 Moscow, Russia;  
ORCID: 0009-0008-4421-0495;  
eLibrary SPIN: 9964-2485;  
e-mail: ignateva\_n\_v\_1@staff.sechenov.ru

**Nikita S. Gavrilov**;  
ORCID: 0009-0008-3062-5251;  
e-mail: gavrilovns2001@mail.ru

**Ekaterina V. Medvedeva**, Cand. Sci. (Biology);  
ORCID: 0000-0002-6263-0986;  
eLibrary SPIN: 1413-5899;  
e-mail: medvedevaekaterina@yandex.ru

**Peter S. Timashev**, Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor;  
ORCID: 0000-0001-7773-2435;  
eLibrary SPIN: 4836-2560;  
e-mail: timashev\_p\_s@staff.sechenov.ru