

**IN VITRO** ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ ХОНДРОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК С НОКАУТОМ В2МА. А. Баринава<sup>1</sup>✉, А. С. Пикина<sup>1</sup>, П. А. Голубинская<sup>1</sup>, Е. С. Ручко<sup>2</sup>, А. В. Еремеев<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Федеральное научно-клиническое центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия<sup>2</sup> Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова, Москва, Россия

В настоящее время клеточные технологии являются одним из инструментов по восстановлению хрящевой ткани. Создание универсального гипоиimmunогенного трансплантата хрящевой ткани из дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) могло бы решить проблему нехватки хрящевого клеточного продукта. Однако на сегодняшний день мало данных об иммуногенности таких тканеинженерных препаратов. Целью работы было создать хрящевой имплант из дифференцированных производных ИПСК, дефицитных по В2М, и оценить его иммуногенность. С помощью ранее разработанного протокола дифференцировали ИПСК как дикого типа, так и с нокаутом В2М в хондроцитарные производные. После проверки качества полученных линий методом полимеразной цепной реакции и иммуноцитохимическим исследованием кокультивировали полученные линии с мононуклеарными клетками периферической крови здорового донора. По окончании кокультивации методом проточной цитометрии оценивали активацию и дегрануляцию CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов по экспрессии CD69 и CD107a на поверхности клеток соответственно. Хондроцитарные производные ИПСК экспрессировали маркеры хрящевой ткани. Цитометрический анализ не выявил существенных различий между иммуногенностью хондроцитарных производных ИПСК с нокаутом и без нокаута В2М, а также клетками хрящевой ткани здорового донора. Иммуногенность хондроцитарных производных была выше, чем у гипоиimmunогенных неотредактированных ИПСК. Нокаутированные по В2М ИПСК демонстрировали тенденцию к большей активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. Таким образом, нокаут В2М в хондроцитарных производных ИПСК не оказал существенного влияния на иммуногенность ткани. Необходимо дополнительное редактирование генов, кодирующих МНС II и CD47, для получения менее иммуногенного продукта.

**Ключевые слова:** ИПСК, регенеративная медицина, хондрогенез, хондроциты, иммуногенность**Финансирование:** получение хондроцитарных производных из ИПСК выполнено в рамках государственного задания №122032300191-2 «Органоид-22». Иммуноцитохимический и ПЦР-анализы экспрессии хондрогенных маркеров в хондроцитарных производных ИПСК, а также оценка иммуногенности этих хондроцитарных производных проводились в рамках проекта РНФ #22-15-00250 «Сравнение хондрогенного потенциала хрящевой ткани, полученной с помощью первичных культур хондроцитов и дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток».**Благодарности:** М. Богомяковой, Л. Беликовой из лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ имени Ю. М. Лопухина ФМБА России за помощь в планировании и проведении эксперимента.**Вклад авторов:** А. А. Баринава — проведение иммунологических тестов, подготовка и написание статьи, поиск литературы; А. С. Пикина — получение хондроцитов пациента и дифференцировка ИПСК в хондроцитарные производные, проведение ИЦХ; П. А. Голубинская — поиск литературы; Е. С. Ручко — проведение ПЦР; А. В. Еремеев — редактирование статьи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФНКЦ ФХМ (протокол № 2019/02 от 09 апреля 2019 г.).✉ **Для корреспонденции:** Анна Александровна Баринава  
ул. Малая Пироговская, д. 1а, 119435, г. Москва, Россия; barinova.anna.al@mail.ru**Статья получена:** 15.11.2023 **Статья принята к печати:** 15.01.2024 **Опубликована онлайн:** 05.02.2024**DOI:** 10.47183/mes.2024.001**IN VITRO** ASSESSMENT OF IMMUNOGENICITY IN CHONDROCYTES OBTAINED FROM THE B2M KNOCKOUT INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLSBarinova AA<sup>1</sup>✉, Pikina AS<sup>1</sup>, Golubinskaya PA<sup>1</sup>, Ruchko ES<sup>2</sup>, Ereemeev AV<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia<sup>2</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Today, the cell-based technologies are one of the instruments used for the cartilage tissue repair. Creation of a universal hypoiimmunogenic cartilage tissue graft from the differentiated derivatives of induced pluripotent stem cells (iPSCs) might solve the problem of the lack of the cartilage cell product. However, currently there is little data on immunogenicity of such tissue-engineered preparations. The study was aimed to create a cartilage implant from the differentiated derivatives of the B2M-deficient iPSCs and assess its immunogenicity. The previously developed protocol was used to ensure differentiation of both wild-type and B2M knockout iPSCs into chondrocyte-like cells. After quality control of the resulting cell lines by conducting polymerase chain reaction and immunocytochemical assessment, the resulting cell lines were co-cultured with the peripheral blood mononuclear cells of a healthy donor. When co-cultivation was over, activation and degranulation of CD8<sup>+</sup> T cells was assessed by flow cytometry analysis based on the CD69 and CD107a expression on the cell surface, respectively. The iPSC-derived chondrocytes expressed the cartilage tissue markers. Flow cytometry analysis revealed no substantial differences in immunogenicity between the derivatives of wild-type and B2M knockout iPSCs, as well as from the cartilage tissue cells of a healthy donor. Immunogenicity of chondrocyte-like cells was higher than that of hypoiimmunogenic non-edited iPSCs. The B2M knockout iPSCs demonstrated a trend towards greater activation of CD8<sup>+</sup> T cells. Thus, the B2M knockout in the iPSC-derived chondrocytes had no significant effect on the tissue immunogenicity. It is necessary to further edit the genes encoding MHC II and CD47 to obtain a less immunogenic product.

**Keywords:** iPSCs, regenerative medicine, chondrogenesis, chondrocytes, immunogenicity**Funding:** chondrocyte-like cells were obtained from iPSCs within the framework of the State Assignment #122032300191-2 "Organoid-22". Immunocytochemical and PCR-based assessment of chondrogenic markers in the iPSC-derived chondrocytes, as well as assessment of immunogenicity of these chondrocyte-like cells were conducted within the framework of the RSF project #22-15-00250 "Comparison of chondrogenic potential of the cartilage tissue obtained using primary chondrocyte culture and using differentiated derivatives of induced pluripotent stem cells".**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to M. Bogomyakova, L. Belikova, Laboratory of Cell Biology, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of FMBA of Russia, for assistance in planning and conducting the experiment.**Author contribution:** Barinova AA — immunological tests, manuscript preparation and writing, search for literature; Pikina AS — collecting chondrocytes from the patient and iPSC differentiation into chondrocyte-like cells, immunohistochemistry; Golubinskaya PA — search for literature; Ruchko ES — conducting PCR; Ereemeev AV — manuscript editing.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of FMBA of Russia (protocol № 2019/02 dated 09 April 2019).✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Barinova  
Malaya Pirogovskaya, 1a, 119435, Moscow, Russia; barinova.anna.al@mail.ru**Received:** 15.11.2023 **Accepted:** 15.01.2024 **Published online:** 05.02.2024**DOI:** 10.47183/mes.2024.001

Восстановление хрящевой ткани с помощью клеточных или тканеинженерных продуктов является важной медицинской задачей вследствие распространенности воспалительно-дегенеративных процессов с вовлечением поверхностных слоев костной и хрящевой ткани. Наиболее часто в мире встречается патология хрящевой ткани — гонартроз. Это полиэтиологическое дегенеративно-дистрофическое заболевание характеризуется поражением суставного хряща, субхондрального и метафизарного слоя кости, а также синовиальной оболочки, связок, капсулы и мышц и сопровождается формированием костно-хрящевых разрастаний, что проявляется болью и ограничением движений в суставе. В России ежегодно выявляют около 80 000 случаев гонартроза. Согласно данным эпидемиологических исследований, этой патологией страдают 8–20% взрослого населения в зависимости от региона [1].

Гонартроз прогрессирует годами, и на разных стадиях заболевания применяют различные подходы в лечении. В соответствии с отечественными клиническими рекомендациями, на ранних этапах заболевания рекомендуют неинвазивную терапию, сочетающую фармакологические и физиотерапевтические методы [2]. Стоит отметить, что фармакологическая составляющая терапии, включающая в себя применение противовоспалительных нестероидных (НПВП) и стероидных препаратов (кратким курсом), носит симптоматический характер и практически не влияет на регенерацию и функциональную активность гиалинового хряща. На более поздних этапах заболевания, при неэффективности неинвазивной терапии и значительных повреждениях хрящевой ткани, появляется необходимость в хирургическом вмешательстве, включающем в себя абразивную хондропластику, корригирующую остеотомию и эндопротезирование сустава [3].

Использование клеточных продуктов для восстановления поврежденной хрящевой ткани стало новым направлением регенеративной медицины. Источником клеток в подобных случаях могут служить мезенхимные стволовые клетки (МСК), аутологичные и аллогенные хондроциты.

Несмотря на то что клеточные продукты на основе аутологичных хондроцитов для восстановления хрящевой ткани уже присутствуют на медицинском и биотехнологическом рынках, они имеют ряд ограничений. Во-первых, пока они больше направлены на коррекцию незначительных повреждений суставных хрящей [4, 5]. Во-вторых, часто в силу ряда причин невозможно получить в достаточном количестве аутологичные хондроциты для создания полноценного хрящевого импланта [2]. В-третьих, при некоторых патологиях хрящевой ткани аутологичный клеточный материал дает хондроциты со сниженной функциональностью, что требует длительного культивирования клеток для наработки необходимого количества материала [6, 7]. В этой связи индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) — многообещающий и емкий источник для получения хондроцитарных производных, однако данные об их безопасности и способности формировать полноценную, функционально активную хрящевую ткань достаточно ограничены, а сведения об иммуногенности противоречивы [8, 9]. К тому же получение ИПСК и их последующая дифференцировка и создание трансплантата — это длительный и дорогостоящий процесс, который нуждается в оптимизации и стандартизации. В

литературе есть данные об успешном приживлении в суставном хряще обезьян ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении. Однако размеры дефекта хрящевой ткани были небольшими, поэтому необходимы дальнейшие исследования на других моделях. Что касается исследования иммуногенности, трансплантат при посадке в хрящевые дефекты через четыре недели не вызывал иммунной реакции у макаков, в то время как в костно-хрящевых дефектах трансплантат, хотя и оставался интактным, был окружен большим скоплением CD3<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов [10].

Перспективным подходом представляется создание и применение хрящевых трансплантатов на основе аллогенных дифференцированных в хондроциты ИПСК с пониженной иммуногенностью, универсальных для всех реципиентов. Ряд исследований показывает успешное создание гипоиммуногенных трансплантатов на основе ИПСК с нокаутом главного комплекса гистосовместимости [11, 12]. Показано, что аллогенный хрящевой трансплантат, полученный из нокаутированных по В2М ИПСК, *in vivo* способствует накоплению натуральных киллеров вокруг костно-хрящевого дефекта [13]. Тем не менее, для хондроцитарных производных человека такие данные еще предстоит получить.

Целью исследования было сравнить иммуногенность образцов тканеинженерных препаратов хрящевой ткани, полученных *in vitro* из различных клеточных источников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Культивирование линий ИПСК с нокаутом и без нокаута В2М

ИПСК (далее — iPS) культивировали, как описано ранее [14]. Линия iPS с нокаутом В2М (iPS\_dB2M) была получена ранее [15].

### Дифференцировка хондроцитарных производных из ИПСК

Размороженные iPS и iPS\_dB2M (для получения хондроцитарных производных без нокаута (iCh) и с нокаутом В2М (iCh\_dB2M) соответственно) были посеяны в шестиугольные планшеты, предварительно обработанные Matrigel (Corning; США), в среде mTeSR1 (STEMCELL Technologies; Канада). Культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторах при +37 °C и 5% CO<sub>2</sub> до достижения монослоя. Все дальнейшие инкубации тоже проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторах при +37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Переводили в среду ДМЕМ/Ф12 (Gibco; США) с добавлением 10% FBS (HiMedia; Индия), 1% GlutaMAX (Gibco; США), 1% пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»; Россия), Chir 10 мкМ (Miltenyi Biotec; США), ретиноевой кислоты 10 нМ (Miltenyi Biotec; США). Культивировали в течение 2 дней. Далее среду заменяли на ДМЕМ/Ф12 с 10% FBS, 1% GlutaMax, 1% пенициллина/стрептомицина, TGFβ 10 нг/мл (Miltenyi Biotec; США), BMP2 10 нг/мл (Miltenyi Biotec; США), B27 (Miltenyi Biotec; США), аскорбиновой кислоты 10 мкМ (Sigma; США), инсулин-трансферрин-селенита 1% («ПанЭко»; Россия). Культивировали в течение двух недель. Далее клетки пересаживали на две лунки шестиугольного планшета. После дифференцировки клетки культивировали в среде ДМЕМ/Ф12 с 10% FBS, 1% GlutaMax, 1% пенициллина/стрептомицин, TGFβ 10 нг/мл, BMP2 10 нг/мл.

### Контроль качества полученных из ИПСК хондроцитарных производных. Иммуноцитохимический анализ

Фиксированные 4%-м параформальдегидом (PFA) монослойные культуры обрабатывали 0,1% раствором Triton-X100: для окрашивания на ядерный маркер — в течение 20 мин, поверхностные и цитоплазматические — 10 мин. После пермеабилзации культуры обрабатывали блокирующим раствором на основе 0,01M PBS с 3% козьей сыворотки и 0,1% Tween в течение 30 мин.

Монослойные культуры окрашивали первичными антителами к ядерному маркеру хондрогенеза Sox 9 (Rabbit, 1 : 400; Invitrogen, США), к маркеру протеогликанового хрящевого внеклеточного матрикса агрекану (Mouse, 1 : 500; Invitrogen, США), маркеру фибриллярного внеклеточного матрикса гиалинового хряща коллагену II типа (Rabbit, 1 : 200; Abcam, Великобритания) и маркеру волокнистого хряща коллагену I типа (Rabbit, 1:800, Invitrogen, США). Окрашивали растворами первичных антител на основе блокирующего раствора в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Затем культуры 3 раза отмывали 0,01 M раствором PBS.

Для окрашивания вторичными антителами использовали Alexa Fluor 555 (Goat, Anti-Rabbit, 1 : 500) и Alexa Fluor 546 (Goat, Anti-Human, 1:500) (Invitrogen; США). Окрашивание проводили в течение 1 ч в темноте. Затем культуры 3 раза отмывали 0,01 M раствором PBS. Для окрашивания ядер использовали 100 нг/мл DAPI (Sigma Aldrich; США). Окрашивание проводили в течение 15 мин, затем культуры 3 раза отмывали 0,01 M раствором PBS.

Анализ окрашенных препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX53F с четырьмя фильтрами флуоресценции (Olympus; Япония), используя программное обеспечение для морфометрии Olympus cellSens Standard (Olympus; Япония).

### Полимеразная цепная реакция

Для ПЦР-анализа экспрессии лизировали 1 млн клеток в буфере RLT (QIAGEN; Германия). РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN; Германия) в соответствии с протоколом производителя. Измерение концентрации тотальной РНК в образце проводили с использованием многорежимного ридера Infinite 200 Pro (Tecan; Швейцария) и программного обеспечения I-control. Для синтеза первой цепи кДНК с матрицы РНК использовали MMLV RT kit («Евроген»; Россия). Синтез проводили в соответствии с протоколом производителя. Для проведения ПЦР в реальном времени на одну лунку

**Таблица.** Используемые в работе праймеры

Название гена	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.о.
SOX9	F: GAAGTCGGTGAAGAACGGGC R: CACGTCGCGGAAGTCGATAG	283
ACAN	F: AGGAGTCCCTGACCTGGTTT R: CCTGACAGATCTGCCTCTCC	167
COL1A2	F: AGGGTGAGACAGGCGAACA R: CCGTTGAGTCCATCTTTGC	184
COL2A1	F: TGGACGCCATGAAGGTTTTCT R: CCATTGATGGTTTCTCCAAACC	142
YWHAZ	F: ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA R: CCGCCAGGACAACCAGTAT	94

96-луночного планшета (SIBio, Scientific Specialities; США) добавляли 5 мкл 5x qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия), 0,8 мкл 10 мкМ праймера (таблица), 18,2 мкл воды и 1 мкл кДНК матрицы. В контрольные лунки планшета вместо кДНК матрицы добавляли еще 1 мкл воды.

Реакцию проводили при использовании термоциклера для амплификации нуклеиновых кислот 1000 CFX Manager исполнения C10000 Touch (Bio-Rad; США) и программного обеспечения CFX Manager. Количество циклов — 39. Анализ результатов проводили в программе Microsoft Excel (Microsoft; США) по методу  $\Delta\Delta Ct$ .

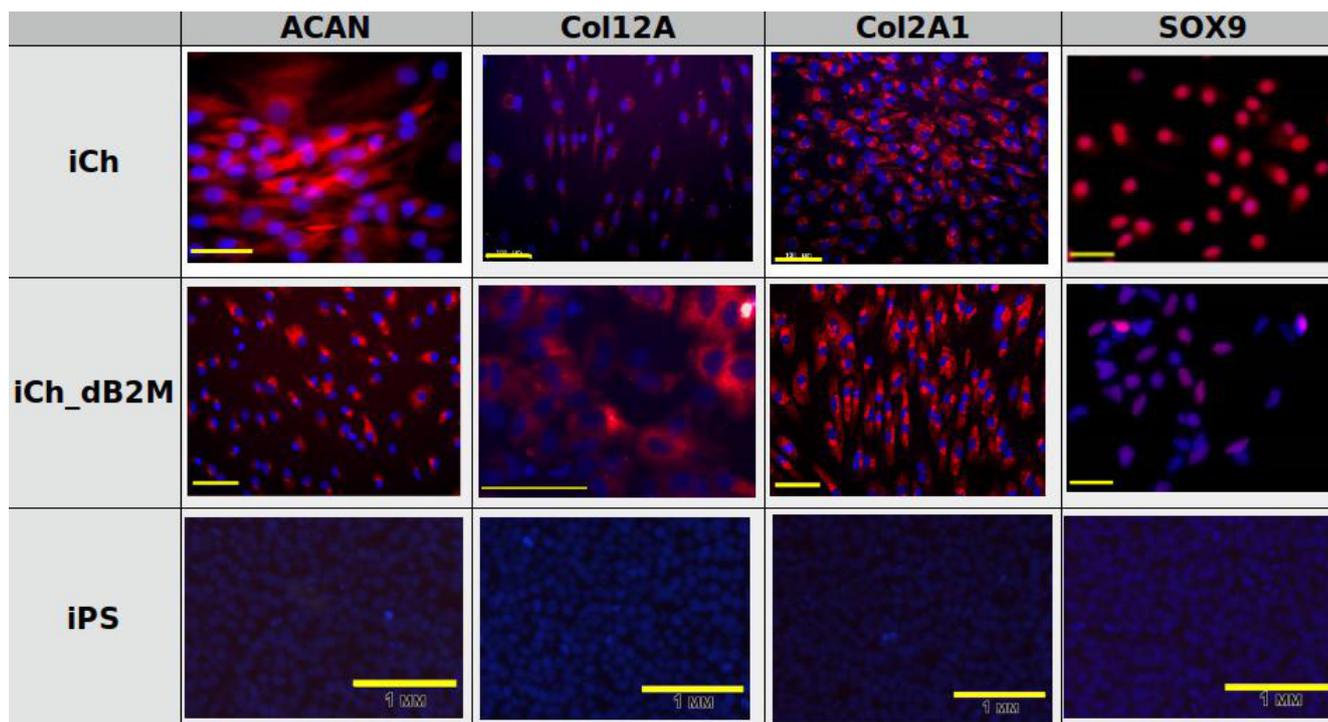
### Получение первичной культуры хондроцитов из донорского материала

Выделение хондроцитов (далее — Chondro) проводили из биопсийного операционного материала пациента. Хрящ отмывали в 15 мл DMEM с 2% пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»; Россия). Затем помещали хрящ в чистую чашку Петри и измельчали стерильными ножницами и скальпелем в присутствии 4 мл среды DMEM с 2% пенициллина/стрептомицина. Промывали в 15 мл пробирке 1 раз той же средой. Кусочки хряща инкубировали в течение 40 мин на качалке при +37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в 10 мл среды DMEM с 2% пенициллина/стрептомицина и коллагеназы IV (Gibco; США) и ферментного препарата коллагеназы («БиоПрепарат»; Россия) в концентрации 3000 ед./мл.

После инкубации кусочки хряща центрифугировали 5 мин при 200 g, производили отмывку 1 раз, добавляли 10 мл среды для культивирования: DMEM/Ф12 с 20% FBS, 1% GlutaMax, 1% пенициллин/стрептомицин и переносили в культуральный флакон T-75, предварительно обработанном 0,1% раствором желатина. Кусочки хряща культивировали при +37 °C и 5% CO<sub>2</sub> до достижения монослоя хондроцитов. Среду меняли раз в три дня.

### Получение первичной культуры фибробластов из донорского материала

Пациенту проводили биопсию кожи предплечья. Биопсию помещали в каплю среды (DMEM («ПанЭко»; Россия) с добавлением 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина) на чашку Петри и разрезали на мелкие кусочки (размером около 1 мм) острым стерильным скальпелем. Полученные кусочки помещали в отдельные чашки Петри диаметром 35 мм в 3 мл культуральной среды и прижимали стерильным покровным стеклом (Menzel Glasser; Германия). Среду меняли два раза в неделю. Через три недели фибробласты (далее — Fibro) отделяли и пассировали с использованием 0,25% раствора ЭДТА (Gibco; США).



**Рис. 1.** Иммуноцитохимический анализ монослойных культур. Синим окрашены ядра клеток, красным и зеленым — исследуемые маркеры. Размер масштабной линейки (показано желтым) составляет 100 мкм — для iCh и iCh\_dB2M, 1000 мкм — для iPS

#### Анализ активации и дегрануляции РВМС после кокультивации с хондроцитарными производными

Для получения мононуклеарных клеток периферической крови (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 9 мл крови здорового донора разводили в 2 раза PBS, аккуратно наслаивали кровь на Ficoll-Paque™ PLUS плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> (GE Healthcare; США) и центрифугировали 350 g в течение 30 мин. Интерфазу отбирали и дважды промывали PBS. Полученные PBMC считали с помощью автоматического счетчика Luna и разводили средой (X-VIVO™ 15 (Lonza; Швейцария) + 100 Ед/мл IL2 + 10% FBS, инактивированной нагреванием) в концентрации 1 млн клеток в миллилитре.

Для проведения анализа, каждая из линий-мишеней (iPS, iPS\_dB2M, Fibro, Chondro, iCh и iCh\_dB2M) была посеяна в три лунки 96-луночного планшета в своей среде для культивирования. По достижении монослоя, среду отбирали и в лунку добавляли 200 мкл суспензии РВМС. Планшет переносили в инкубатор при +37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для анализа активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов через сутки и через пять дней ресуспендировали клетки и отбирали их для последующего цитометрического анализа.

Для анализа дегрануляции CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов через 1 ч инкубации добавляли в лунки Brefeldin A в концентрации 100 нг/мл и инкубировали клетки на +37 °C и 5% CO<sub>2</sub> еще 4 ч. Затем клетки отбирали для цитометрического анализа.

#### Проточная цитометрия

Для оценки активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов использовали антитела CD3-PERCP-Cy5.5 (Sony; Япония), CD8-BrilliantViolet421 (BD Bioscience; США), CD69-FITC (Sony; Япония)

Для анализа дегрануляции CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов использовали антитела CD8-BrilliantViolet421 (BD Bioscience;

США), CD3-PE (Abcam; Великобритания), CD107a-APC (Sony; Япония). Цитометрический анализ производили с помощью проточного цитометра NovoCyte Flow Cytometer. Данные цитометрии обрабатывали с помощью программы FlowJo (Tree Star Inc.; США).

#### Статистический анализ

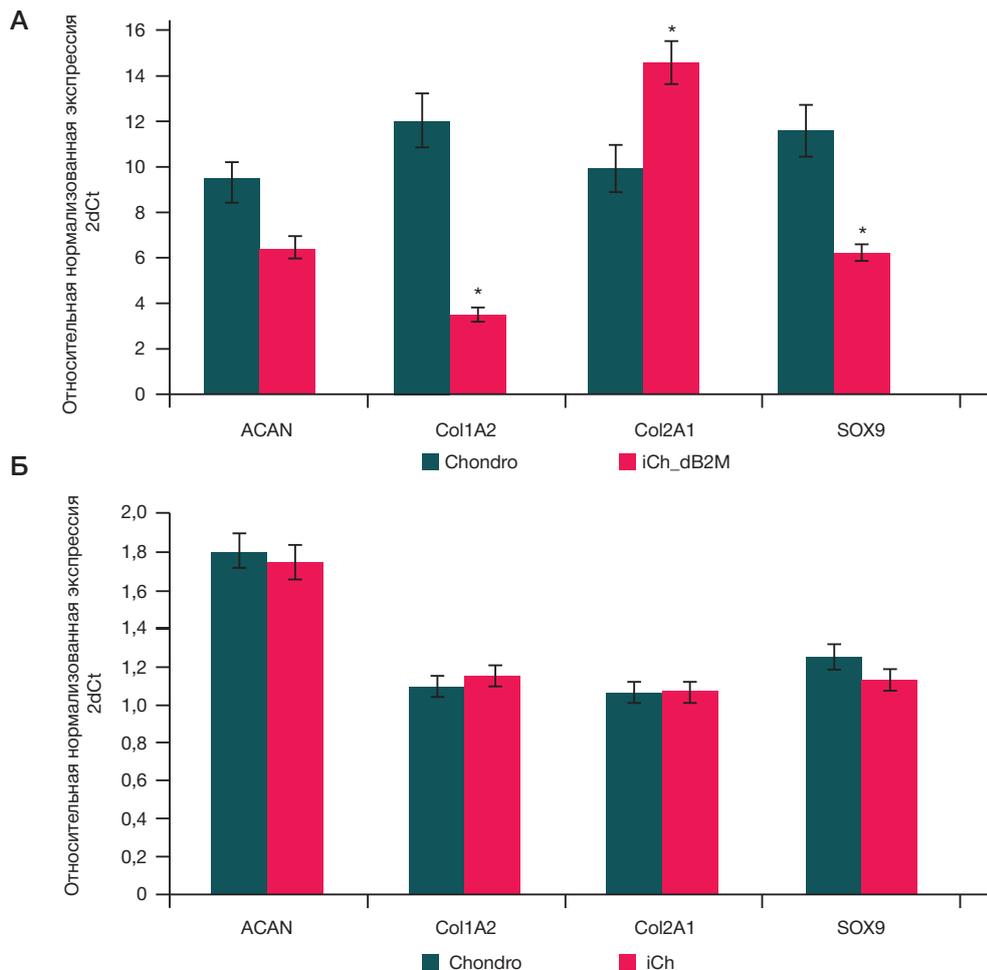
Для сравнения долей активированных и дегранулировавших CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов использовали непарный *t*-критерий Стьюдента и ANOVA. Статистически значимыми считали различия с *p*-значением меньше 0,05. Расчет выполняли на персональном компьютере с использованием приложения Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp; USA) и программы SPSS Statistics 17.0 (IBM; США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Контроль качества полученных из ИПСК хондроцитарных производных

Хондроцитарные производные, полученные путем направленной дифференцировки из ИПСК с нокаутом V2M и без него, исследовали на экспрессию основных хондрогенных маркеров. При анализе иммуноцитохимического маркирования наблюдали флуоресценцию белков хондроцитарного матрикса коллагенов I и II типа (COL1, COL2), агрекана (ACAN), а также ядерного белка SOX9 в обеих линиях (рис. 1). При этом ИПСК на данные маркеры не окрашивали.

ПЦР в реальном времени также демонстрировал экспрессию этих хондрогенных маркеров как в производных с нокаутом V2M, так и без, при этом экспрессия коллагена I типа в клетках линии iCh\_dB2M была ниже, чем в контрольной группе нативных хондроцитов человека, а экспрессия коллагена II типа, напротив, была выше (рис. 2). Кроме того, в производных ИПСК с



**Рис. 2.** Относительная экспрессия хондроцитарных маркеров в линиях хондроцитов человека (Chondro), хондроцитарных производных с нокаутом B2M (iCh\_dB2M) (А) и без нокаута B2M (iCh) (Б). \* — статистически значимые различия по экспрессии гена в сравнении с хондроцитами человека,  $p < 0,05$ , непарный тест Стьюдента

нокаутом B2M наблюдали более низкую экспрессию ACAN и SOX9 по сравнению с хондроцитами человека, а также более низкую интенсивность флуоресценции в сравнении с линией без нокаута. В клетках линии iCh не выявили значительных отличий от контрольной группы в экспрессии рассматриваемых хондрогенных маркеров.

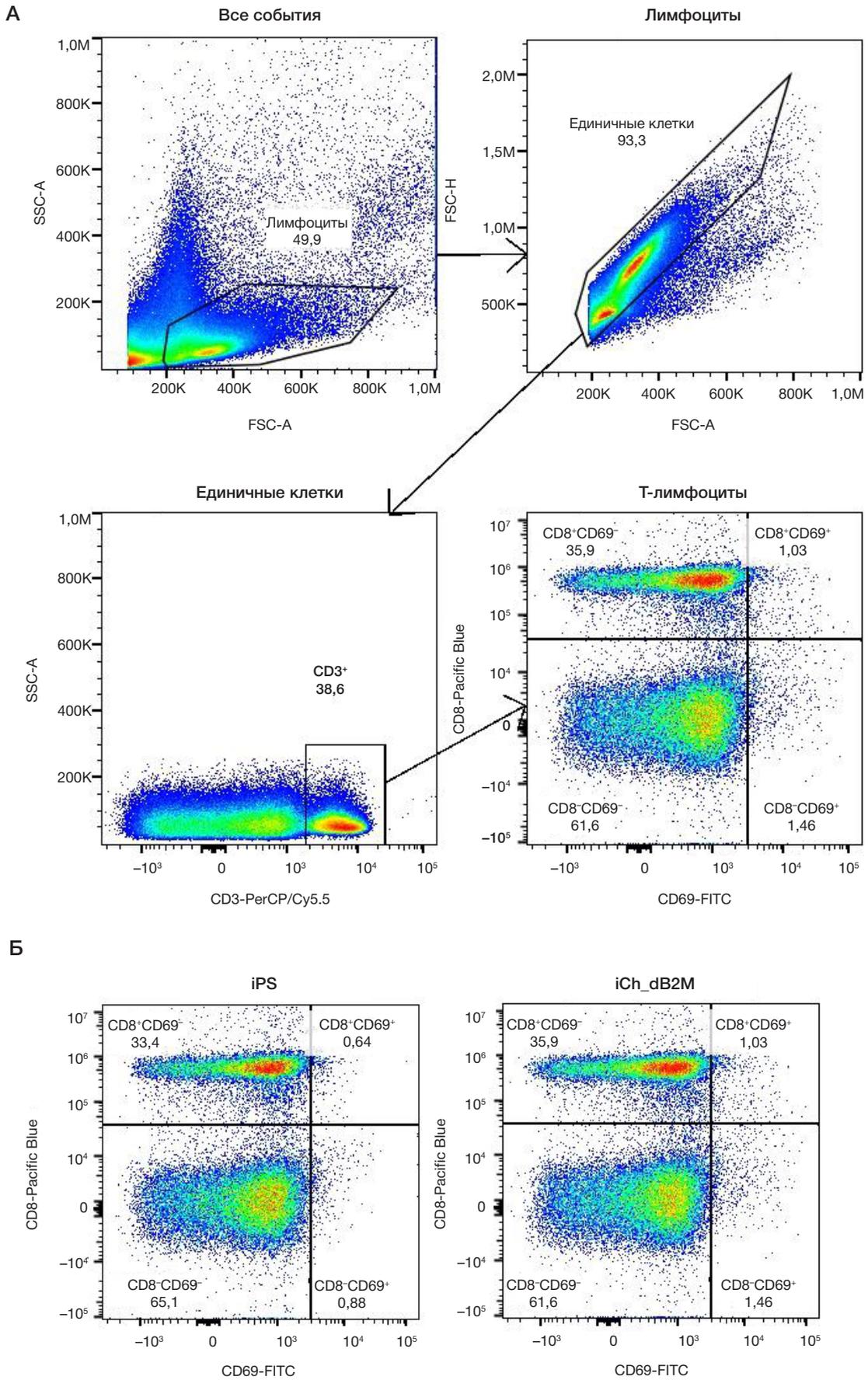
#### Анализ иммуногенности хондроцитарных производных

MHC I, главный комплекс гистосовместимости I класса, экспрессируется практически на всех клетках организма. Основной функцией этого белка является презентация эндогенных пептидов T-лимфоцитам. Гены, кодирующие MHC I, высокополиморфны и различаются от человека к человеку, равно как и набор пептидов, способных презентироваться в соответствующей молекуле MHC I. CD8<sup>+</sup>-T-лимфоциты при созревании приобретают толерантность к собственным эндогенным пептидам и MHC I, однако при попадании чужеродных клеток высока вероятность неспецифического распознавания T-клеточным рецептором комплекса «пептид — MHC I». Поэтому основное внимание уделили ответу CD8<sup>+</sup>- T-лимфоцитов.

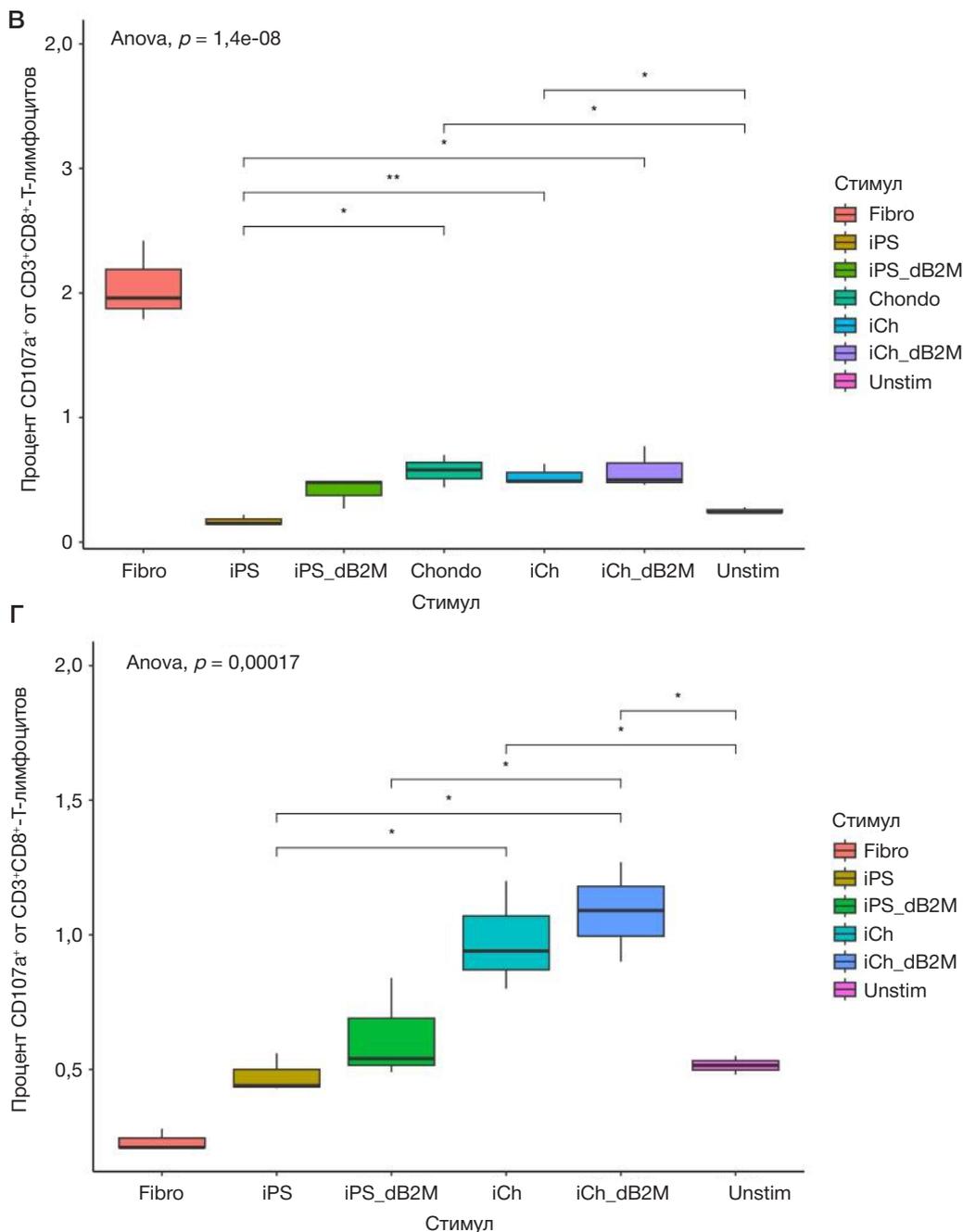
Чтобы оценить иммуногенность iCh-dB2M, кокультивировали эту линию с PBMC здорового донора. После пятидневной кокультурации определяли процент активированных CD69<sup>+</sup>- CD8<sup>+</sup>-T-лимфоцитов. CD69, мембранный рецептор С-лектина второго типа, широко используют в качестве маркера ранней активации

лимфоцитов. Экспрессия CD69 быстро индуцируется на поверхности T-лимфоцитов после связывания T-клеточного рецептора и CD3, что приводит к секреции цитокинов и пролиферации активированных клеток. Ряд статей указывает на то, что максимума экспрессия CD69 на T-клетках достигает через 24 ч после стимуляции, а затем начинает снижаться [16, 17]. Поэтому мы провели повторный эксперимент, где измерили активацию T-клеток через сутки после начала кокультурации.

Результаты цитометрического анализа представлены на рис. 3. В качестве положительного контроля использовали фибробласты здорового донора, а в качестве отрицательного — ИПСК, так как они обладают сниженной иммуногенностью [18]. Независимо от длительности кокультурации, процент активированных CD8<sup>+</sup>-T-лимфоцитов при кокультурации с iCh-dB2M значимо не отличался от такового при кокультурации с iCh и хондроцитами и был выше, чем при кокультурации с iPS или без кокультурации. С одной стороны, это может означать, что нокаута B2M недостаточно, чтобы полученные в результате клетки стали гипои иммуногенными [11, 19]. С другой стороны, все использованные линии при пятидневной кокультурации приводили к активации значимо меньшего процента CD8<sup>+</sup>-T-лимфоцитов ( $p < 0,01$ , непарный  $t$ -тест; данные не показаны) по сравнению с фибробластами, что, возможно, свидетельствует о сниженной иммуногенности хондроцитоподобных клеток и хондроцитов как таковых. По литературным



**Рис. 3.** Цитометрический анализ активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. **A.** Схема гейтирования. **Б.** Процент активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов при кокультурации с iPS (слева) и iCh-dB2M (справа). **В.** Сравнительный анализ активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов после пятидневной кокультурации с линиями-мишенями. **Г.** Сравнительный анализ активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов после суточной кокультурации с линиями-мишенями. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ , непарный тест Стьюдента



**Рис. 3.** (Продолжение) Цитометрический анализ активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. **А.** Схема гейтирования. **Б.** Процент активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов при кокультивации с iPS (слева) и iCh-dB2M (справа). **В.** Сравнительный анализ активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов после пятидневной кокультивации с линиями-мишенями. **Г.** Сравнительный анализ активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов после суточной кокультивации с линиями-мишенями. \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ , непарный тест Стьюдента

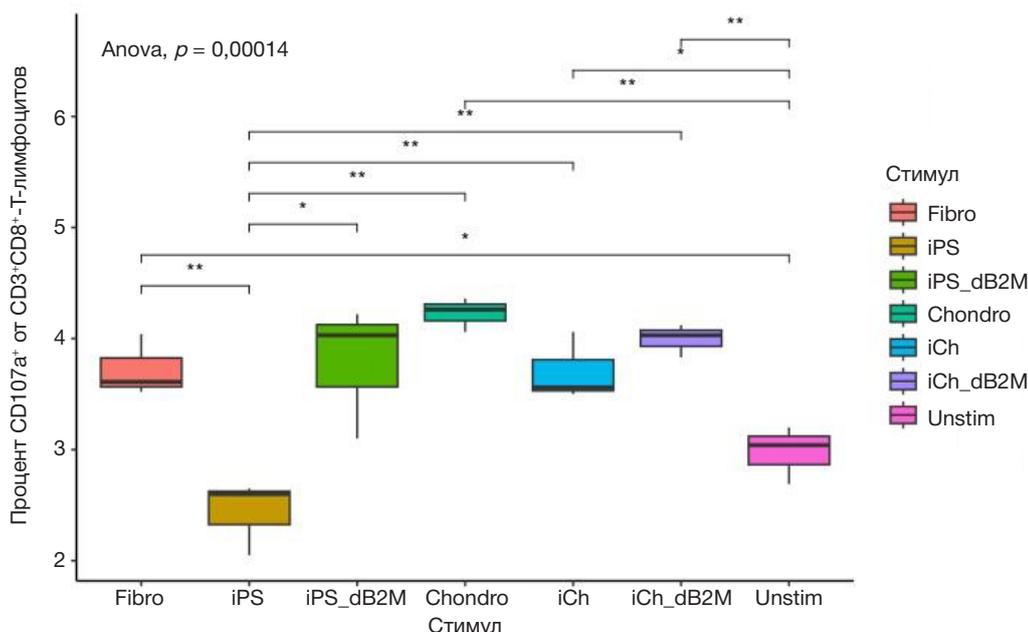
данным, хондроциты способны создавать вокруг себя противовоспалительное микроокружение, что, вероятно, повлияло на результаты эксперимента [20, 21]. В то же время кокультивация в течение одного дня с фибробластами здорового донора не привела к активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов. Вероятно, такому результату способствовало несколько факторов. Во-первых, по результатам цитометрии, экспрессия МНС I на фибробластах этого донора была снижена по сравнению с другими линиями фибробластов, представленными в нашей лаборатории (данные не показаны). Во-вторых, на результат эксперимента могло повлиять частичное совпадение аллеля МНС I между PBMC и фибробластами. В результате, в случае пятидневной стимуляции имел место накопительный эффект, приводящий к активации

значимо большего числа CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, в то время как суточной стимуляции для данной линии оказалось недостаточно.

Таким образом, хондроцитарные производные iPS способны активировать CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты из PBMC. Нокаут B2M не оказывает при этом существенного влияния на иммуногенность хондроцитарных производных iPS.

Для оценки иммуногенности хондроцитарных производных измеряли также цитотоксический ответ CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов при кокультивации линий с PBMC.

CD107a, он же LAMP-1, является лизосомно-ассоциированным мембранным гликопротеином. При дегрануляции CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцита, лизосомная гранула, содержащая в себе эффекторные литические молекулы, сливается с внешней мембраной CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцита. В



**Рис. 4.** Сравнительный анализ дегрануляции CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов после пятичасовой кокультурации с линиями-мишенями. Непарный тест Стьюдента, \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$

результате этого содержимое гранулы доставляется в клетку-мишень, а CD107a оказывается на поверхности клетки и становится доступен для окрашивания антителами как маркер цитотоксичности.

После пятичасовой кокультурации с линиями-мишенями в присутствии Брефельдина А снимали PBMC и окрашивали их антителами к CD3, CD8 и CD107a, после чего проводили цитометрический анализ.

Полученные данные в целом аналогичны предыдущим двум результатам (рис. 4). Экспрессия CD107a, и, как следствие, цитотоксическая активность CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, в присутствии хондроцитарных производных с нокаутом B2M, хондроцитов и фибробластов была значимо выше ( $p < 0,05$ ; непарный тест Стьюдента), чем в присутствии iPS и без линии-мишени. Это свидетельствует об иммуногенности выбранных нами линий. Интересно, что iPS с нокаутом B2M также вызывали цитотоксический ответ. Подобных экспериментальных данных в литературе нами обнаружено не было. Учитывая, что схожая тенденция увеличения иммуногенности у iPS\_dB2M по сравнению с iPS наблюдалась на протяжении всех трех экспериментов, можно допустить, что для данной линии полученный результат не является артефактом. В таком случае, вероятно, нокаут B2M каким-то образом повлиял на транскриптом линии [22]. В дальнейшем мы планируем проверить транскриптом линии iPS-dB2M и сравнить его с исходной линией.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование клеточных продуктов для восстановления поврежденной хрящевой ткани в настоящее время является одним из самых перспективных и действенных видов терапии [23–25]. Тем не менее, ограниченные количества хрящевого клеточного материала являются серьезным препятствием для повсеместного использования данного вида лечения. За последние годы стало возможным получать клетки хрящевой ткани путем дифференцировки из ИПСК, что значительно упростило получение необходимого количества аутологичного клеточного источника для создания трансплантата. Однако данная

процедура дорогостоящая, занимает несколько месяцев и требует валидации. Создание универсального гипоиммуногенного трансплантата помогло бы решить проблему недостатка клеточного материала для создания *in vitro* хрящевой ткани. Тем не менее, биобезопасность такого продукта не изучена.

Мы получили хондроцитарные производные из iPSC с нокаутом B2M и без него и провели анализ экспрессии хондрогенных маркеров. Экспрессия таких маркеров, как SOX9, агрекан и коллагены I и II типов, свидетельствует о приобретении производными ИПСК хондроцитарного фенотипа, что демонстрировали обе линии производных в нашем эксперименте. Стоит отметить, что по результатам ПЦР в реальном времени в iCh\_dB2M Col1 экспрессировался на более низком уровне, а Col2 — на более высоком, по сравнению с хондроцитами человека. Это подтверждает преобладание фенотипа гиалинового хряща в дифференцированных производных с нокаутом B2M, что более предпочтительно в перспективе клинического применения [26]. В то же время это может свидетельствовать и о появлении фибротических черт нативных хондроцитов человека вследствие культивирования [27]. Хотя экспрессия Sox9 у iCh\_B2M была ниже, чем у iCh, нет оснований полагать, что это значимо отразилось на функциональности хондроцитарных производных [28, 29].

Полное удаление с поверхности клеток MHC I должно было привести к снижению иммуногенности хондроцитарных производных за счет избегания распознавания комплекса «MHC I–аутопептид» CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитами. Однако, по полученным нами результатам, нокаут B2M является недостаточной мерой для снижения иммуногенности хондроцитарных производных. Во всех трех проведенных нами экспериментах иммунный ответ CD8<sup>+</sup>-Т-клеток на хондроцитарные производные с деплецией B2M был значимо выше, чем на ИПСК. Существует несколько механизмов, благодаря которым могла произойти активация CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов.

Согласно одному из них, CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоциты активировались не за счет непосредственного взаимодействия с хондроцитарными производными,

а благодаря антигенпрезентирующим клеткам (АПК), присутствующим в РВМС. Как известно, антигенпрезентирующие клетки способны представлять пептиды поглощенных частиц в контексте МНС I и МНС II. Для активации CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (и, как следствие, экспрессии CD69) достаточно распознать чужеродный пептид на АПК, а также, в некоторых случаях, получить стимуляцию от CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов [30, 31]. Что касается дегрануляции, показана способность CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов убивать опухолевые клетки, потерявшие МНС I. Этот эффект достигался в присутствии АПК, независимо от NK-клеток. Распознавание происходит за счет связывания рецептора NKG2D Т-клеток с лигандами (NKG2DL) на клетках-мишенях, а убийство — за счет секреции гранзимов [32]. В то же время Богомякова с соавторами показали, что фибробластные производные iPS экспрессируют на своей поверхности в 1,5 раза больше лигандов NKG2D по сравнению с фибробластами здорового человека [14]. Таким образом, можно предположить, что хондроцитарные производные из нашего эксперимента повысили экспрессию NKG2D лигандов, что сделало их потенциальной мишенью как для CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, так и для NK-клеток. Хотя хондроциты (и, по-видимому, хондроцитарные производные iPS) создают вокруг себя противовоспалительное окружение [20, 21], это, судя по всему, не является абсолютной гарантией отсутствия иммунного ответа. Важно помнить, что хондроциты, попавшие в провоспалительный контекст (который неизбежен при трансплантации тканеинженерного препарата хряща), способны экспрессировать МНС II

[21]. Хотя для хондроцитарных производных iPS этого не было показано *in vitro* [27], тестов *in vivo* на настоящий момент не проводилось. Поэтому, чтобы избежать иммунного ответа CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, необходимо нокаутить МНС II в хондроцитарных производных. В дополнение, ряд исследований демонстрирует успешное получение гипоиммуногенных производных iPS за счет нокаута МНС I, МНС II и гиперэкспрессии CD47 для регулирования NK-клеточного ответа [11, 12]. Эти данные, в совокупности, оставляют возможность для доработки универсального трансплантата хрящевой ткани на основе дифференцированных производных ИПСК.

## Выводы

Полученные хондроцитарные производные ИПСК обладают такой же невысокой иммуногенностью, как и хондроциты человека, однако они вызывают больший иммунный ответ, чем гипоиммуногенные ИПСК. С одной стороны, это говорит о том, что полученные хондроциты потенциально могут служить источником продукта для терапии хрящевой ткани суставов, но с другой стороны, данное исследование показывает потенциальные риски, связанные с нестабильностью клеток после редактирования и избеганием иммунного ответа в случае туморогенеза. Таким образом, нокаут В2М не является достаточным условием гипоиммуногенности получаемых прототипов из таких клеток ткани, а хондроцитарные производные ИПСК нуждаются в дополнительных модификациях.

## Литература

1. Кабалык М. А. Распространенность остеоартрита в России: региональные аспекты динамики статистических показателей за 2011–2016 гг. Научно-практическая ревматология. 2018; 56 (4): 416–22. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-416-422>.
2. 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). DOI: 10.3390/ijms19082366.
3. Pintan GF, de Oliveira ASJ, Lenza M, Antonioli E, Ferretti M. Update on biological therapies for knee injuries: osteoarthritis. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2014; 7 (3): 263–9. DOI: 10.1007/s12178-014-9229-8.
4. Martinčič D, Leban J, Filardo G, et al. Autologous chondrocytes versus filtered bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for knee cartilage repair—a prospective study. *Int Orthop.* 2021; 45 (4): 931–9. DOI: 10.1007/s00264-020-04727-2.
5. Leigheb M, Bosetti M, De Consoli A, Borrone A, Cannas M, Grassi F. Chondral tissue engineering of the reumatoid knee with collagen matrix autologous chondrocytes implant. *Acta Biomed.* 2017; 88 (4S): 107–13. DOI: 10.23750/abm.v88i4-S.6801.
6. Davies RL, Kuiper NJ. Regenerative medicine: a review of the evolution of autologous chondrocyte implantation (ACI) therapy. *Bioeng (Basel, Switzerland).* 2019; 6 (1). DOI: 10.3390/bioengineering6010022.
7. Vonk LA, de Windt TS, Kragten AHM, et al. Enhanced cell-induced articular cartilage regeneration by chondrons; the influence of joint damage and harvest site. *Osteoarthr Cartil.* 2014; 22 (11): 1910–7. DOI: 10.1016/j.joca.2014.08.005.
8. Khan NM, Diaz-Hernandez ME, Chihab S, et al. Differential chondrogenic differentiation between iPSC derived from healthy and OA cartilage is associated with changes in epigenetic regulation and metabolic transcriptomic signatures. *Elife.* 2023; 12. DOI: 10.7554/eLife.83138.
9. Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, et al. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from hand osteoarthritis patient-derived fibroblasts. *Sci Rep.* 2020; 10. DOI: 10.1038/s41598-020-61071-6.
10. 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.
11. 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): 252–8. DOI: 10.1038/s41587-019-0016-3.
12. Trionfani P, Romano E, Varinelli M, et al. Hypoimmunogenic human pluripotent stem cells as a powerful tool for liver regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (14). DOI: 10.3390/ijms241411810.
13. Okutani Y, Abe K, Yamashita A, Morioka M, Matsuda S, Tsumaki N. 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.
14. 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.
15. Bogomiakova ME, Sekretova EK, Ereemeev AV, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPCMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Stem Cell Res.* 2021; 55: 102451. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102451>.
16. Simms PE, Ellis TM. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;

- 3 (3): 301–4. DOI: 10.1128/cdli.3.3.301-304.1996.
17. Zimmerman M, Yang D, Hu X, et al. IFN- $\gamma$  Upregulates survivin and lfi202 expression to induce survival and proliferation of tumor-specific T cells. *PLoS One*. 2010; 5 (11): e14076. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014076>.
  18. Yamasaki S, Sugita S, Horiuchi M, et al. Low Immunogenicity and immunosuppressive properties of human ESC- and iPSC-derived retinas. *Stem Cell Reports*. 2021; 16 (4): 851–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.021>.
  19. Petrus-Reurer S, Winblad N, Kumar P, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells lacking human leukocyte antigen class I and II. *Stem cell reports*. 2020; 14 (4): 648–62. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.02.006.
  20. Pereira RC, Martinelli D, Cancedda R, Gentili C, Poggi A. Human articular chondrocytes regulate immune response by affecting directly T cell proliferation and indirectly inhibiting monocyte differentiation to professional antigen-presenting cells. *Front Immunol*. 2016; 7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00415>.
  21. Osiecka-Iwan A, Hyc A, Radomska-Lesniewska DM, Rymarczyk A, Skopinski P. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. *Cent J Immunol*. 2018; 43 (2): 209–19. DOI: 10.5114/cej.2018.77392.
  22. Tsai HH, Kao HJ, Kuo MW, et al. Whole genomic analysis reveals atypical non-homologous off-target large structural variants induced by CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Nat Commun*. 2023; 14 (1): 5183. DOI: 10.1038/s41467-023-40901-x.
  23. Ramezankhani R, Torabi S, Minaei N, et al. Two decades of global progress in authorized advanced therapy medicinal products: an emerging revolution in therapeutic strategies. *Front cell Dev Biol*. 2020; 8: 547653. DOI: 10.3389/fcell.2020.547653.
  24. Kim J, Park J, Song SY, Kim E. Advanced therapy medicinal products for autologous chondrocytes and comparison of regulatory systems in target countries. *Regen Ther*. 2022; 20: 126–37. DOI: 10.1016/j.reth.2022.04.004.
  25. Colombini A, Libonati F, Lopa S, Peretti GM, Moretti M, de Girolamo L. Autologous chondrocyte implantation provides good long-term clinical results in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2023; 31 (6): 2338–48. DOI: 10.1007/s00167-022-07030-2.
  26. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPSC cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015; 70: 48–54. DOI: 10.1016/j.bone.2014.07.011.
  27. Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Eng Part A*. 2016; 22 (23-24): 1367–75. DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0189.
  28. Aigner T, Gebhard PM, Schmid E, Bau B, Harley V, Pöschl E. SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2003; 22 (4): 363–72. DOI: 10.1016/s0945-053x(03)00049-0.
  29. Lee J, Smeriglio P, Chu CR, Bhutani N. Human iPSC-derived chondrocytes mimic juvenile chondrocyte function for the dual advantage of increased proliferation and resistance to IL1 $\beta$ . *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 244. DOI: 10.1186/s13287-017-0696-x.
  30. Oladipo OO, Adedeji BO, Adedokun SP, Gbadamosi JA, Salaudeen M. Regulation of effector and memory CD8+T cell differentiation: a focus on orphan nuclear receptor NR4A family, transcription factor, and metabolism. *Immunol Res*. 2023; 71 (3): 314–27. DOI: 10.1007/s12026-022-09353-1.
  31. Henrickson SE, von Andrian UH. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19 (3): 249–58. DOI: 10.1016/j.coi.2007.04.013.
  32. Lerner EC, Woroniecka KI, D'Anniballe VM, et al. CD8+ T cells maintain killing of MHC- I-negative tumor cells through the NKG2D–NKG2DL axis. *Nat Cancer*. 2023; 4 (9): 1258–72. DOI: 10.1038/s43018-023-00600-4.

## References

1. Kabalyk MA. Rasprostranennost' osteoartrita v Rossii: regional'nye aspekty dinamiki statisticheskikh pokazatelej za 2011–2016 gg. *Nauchno-prakticheskaja revmatologija*. 2018; 56 (4): 416–22. Dostupno po slyke: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-416-422>. Russian.
2. 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). DOI: 10.3390/ijms190823660.
3. Pintan GF, de Oliveira ASJ, Lenza M, Antonioli E, Ferretti M. Update on biological therapies for knee injuries: osteoarthritis. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2014; 7 (3): 263–9. DOI: 10.1007/s12178-014-9229-8.
4. Martinčić D, Leban J, Filardo G, et al. Autologous chondrocytes versus filtered bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for knee cartilage repair—a prospective study. *Int Orthop*. 2021; 45 (4): 931–9. DOI: 10.1007/s00264-020-04727-2.
5. Leigh M, Bosetti M, De Consoli A, Borrone A, Cannas M, Grassi F. Chondral tissue engineering of the rheumatoid knee with collagen matrix autologous chondrocytes implant. *Acta Biomed*. 2017; 88 (4S): 107–13. DOI: 10.23750/abm.v88i4-S.6801.
6. Davies RL, Kuiper NJ. Regenerative medicine: a review of the evolution of autologous chondrocyte implantation (ACI) therapy. *Bioeng (Basel, Switzerland)*. 2019; 6 (1). DOI: 10.3390/bioengineering6010022.
7. Vonk LA, de Windt TS, Kragten AHM, et al. Enhanced cell-induced articular cartilage regeneration by chondrons; the influence of joint damage and harvest site. *Osteoarthr Cartil*. 2014; 22 (11): 1910–7. DOI: 10.1016/j.joca.2014.08.005.
8. Khan NM, Diaz-Hernandez ME, Chihab S, et al. Differential chondrogenic differentiation between iPSC derived from healthy and OA cartilage is associated with changes in epigenetic regulation and metabolic transcriptomic signatures. *Elife*. 2023; 12. DOI: 10.7554/eLife.83138.
9. Viñuelas R, Sanjurjo-Rodríguez C, Piñeiro-Ramil M, et al. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from hand osteoarthritis patient-derived fibroblasts. *Sci Rep*. 2020; 10. DOI: 10.1038/s41598-020-61071-6.
10. 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.
11. 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): 252–8. DOI: 10.1038/s41587-019-0016-3.
12. Trionfini P, Romano E, Varinelli M, et al. Hypoimmunogenic human pluripotent stem cells as a powerful tool for liver regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (14). DOI: 10.3390/ijms241411810.
13. Okutani Y, Abe K, Yamashita A, Morioka M, Matsuda S, Tsumaki N. 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.
14. 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.
15. Bogomiakova ME, Sekretova EK, Eremeev AV, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPCMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *Stem Cell Res*. 2021; 55: 102451. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102451>.
16. Simms PE, Ellis TM. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996;

- 3 (3): 301–4. DOI: 10.1128/cdli.3.3.301-304.1996.
17. Zimmerman M, Yang D, Hu X, et al. IFN- $\gamma$  Upregulates survivin and lfi202 expression to induce survival and proliferation of tumor-specific T cells. *PLoS One*. 2010; 5 (11): e14076. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014076>.
  18. Yamasaki S, Sugita S, Horiuchi M, et al. Low Immunogenicity and immunosuppressive properties of human ESC- and iPSC-derived retinas. *Stem Cell Reports*. 2021; 16 (4): 851–67. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.021>.
  19. Petrus-Reurer S, Winblad N, Kumar P, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells lacking human leukocyte antigen class I and II. *Stem cell reports*. 2020; 14 (4): 648–62. DOI: 10.1016/j.stemcr.2020.02.006.
  20. Pereira RC, Martinelli D, Cancedda R, Gentili C, Poggi A. Human articular chondrocytes regulate immune response by affecting directly T cell proliferation and indirectly inhibiting monocyte differentiation to professional antigen-presenting cells. *Front Immunol*. 2016; 7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00415>.
  21. Osiecka-Iwan A, Hyc A, Radoska-Lesniewska DM, Rymarczyk A, Skopinski P. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. *Cent J Immunol*. 2018; 43 (2): 209–19. DOI: 10.5114/ceji.2018.77392.
  22. Tsai HH, Kao HJ, Kuo MW, et al. Whole genomic analysis reveals atypical non-homologous off-target large structural variants induced by CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Nat Commun*. 2023; 14 (1): 5183. DOI: 10.1038/s41467-023-40901-x.
  23. Ramezankhani R, Torabi S, Minaei N, et al. Two decades of global progress in authorized advanced therapy medicinal products: an emerging revolution in therapeutic strategies. *Front cell Dev Biol*. 2020; 8: 547653. DOI: 10.3389/fcell.2020.547653.
  24. Kim J, Park J, Song SY, Kim E. Advanced therapy medicinal products for autologous chondrocytes and comparison of regulatory systems in target countries. *Regen Ther*. 2022; 20: 126–37. DOI: 10.1016/j.reth.2022.04.004.
  25. Colombini A, Libonati F, Lopa S, Peretti GM, Moretti M, de Girolamo L. Autologous chondrocyte implantation provides good long-term clinical results in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2023; 31 (6): 2338–48. DOI: 10.1007/s00167-022-07030-2.
  26. Tsumaki N, Okada M, Yamashita A. iPSC cell technologies and cartilage regeneration. *Bone*. 2015; 70: 48–54. DOI: 10.1016/j.bone.2014.07.011.
  27. Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Eng Part A*. 2016; 22 (23-24): 1367–75. DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0189.
  28. Aigner T, Gebhard PM, Schmid E, Bau B, Harley V, Pöschl E. SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes. *Matrix Biol*. 2003; 22 (4): 363–72. DOI: 10.1016/s0945-053x(03)00049-0.
  29. Lee J, Smeriglio P, Chu CR, Bhutani N. Human iPSC-derived chondrocytes mimic juvenile chondrocyte function for the dual advantage of increased proliferation and resistance to IL1 $\beta$ . *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 244. DOI: 10.1186/s13287-017-0696-x.
  30. Oladipo OO, Adedeji BO, Adedokun SP, Gbadamosi JA, Salaudeen M. Regulation of effector and memory CD8+T cell differentiation: a focus on orphan nuclear receptor NR4A family, transcription factor, and metabolism. *Immunol Res*. 2023; 71 (3): 314–27. DOI: 10.1007/s12026-022-09353-1.
  31. Henrickson SE, von Andrian UH. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr Opin Immunol*. 2007; 19 (3): 249–58. DOI: 10.1016/j.coi.2007.04.013.
  32. Lerner EC, Woroniecka KI, D'Anniballe VM, et al. CD8+ T cells maintain killing of MHC- I-negative tumor cells through the NKG2D–NKG2DL axis. *Nat Cancer*. 2023; 4 (9): 1258–72. DOI: 10.1038/s43018-023-00600-4.