

## Молекулярные особенности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и плаценты для хондрогенной дифференцировки клеток *in vitro*

А.А. ЖЕРНОСЕЧЕНКО, Я.И. ИСАЙКИНА, Е.Г. ЛЯХ

Исследованы особенности хондрогенного потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из костного мозга и плаценты. Результаты показали, что нативные МСК из разных источников отличаются по уровню экспрессии хондрогенных маркеров и ответу на факторы-индукторы хондрогенеза, поэтому для эффективной дифференцировки МСК необходим экспериментальный подбор этих факторов.  
**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, хондрогенная дифференцировка.

The features of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC) have been studied. The results showed that native MSC obtained from different tissues showed a different level of expression of chondrogenic markers. The different effectiveness of the use of differentiation factors confirms the need for experimental selection of inducing factors. Successful chondrogenic differentiation of MSCs requires a multivariate analysis of all conditions.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, chondrogenic differentiation.

**Введение.** Суставной хрящ имеет низкие репаративные свойства из-за малого количества хондроцитов и отсутствия кровоснабжения, поэтому восстановление хрящевой ткани сталкивается с многочисленными проблемами. Артроскопическая санация, микроперелом, аутологичная или аллогенная трансплантация хряща – это прежде всего симптоматическое лечение и обезболивание, которые не способствуют регенерации поврежденной хрящевой ткани или уменьшению воспаления суставов. Кроме того, замещенная волокнистая хрящевая ткань отличается от натурального гиалинового хряща [1].

В связи с низкой эффективностью консервативного лечения патологий хрящевой ткани существует запрос на поиск альтернативных методов, и перспективой может являться клеточная терапия с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Эти клетки могут быть увеличены *ex vivo* до клинически необходимого (значимого) количества и после экспансии способны сохранять хондрогенный потенциал.

МСК, выделенные из различных тканей, интенсивно изучаются и охарактеризованы многими исследовательскими группами [2]. На данный момент разработаны протоколы получения МСК из различных источников, в частности, из костного мозга, жировой ткани, плаценты, пуповинной крови, пульпы зуба, кожи и подкожной клетчатки, слюнных желез, менструальной крови, периферической крови и т. д. [3]. Тканевые источники МСК принято делить на взрослые (костный мозг, периферическая кровь, жировая ткань, лёгочная ткань и сердце и т. д.) и неонатальные (пуповинная кровь, амниотическая жидкость, плацента, плодные оболочки, пупочный канатик, Вартонов студень и т. д.) [4].

Для унификации характеристик МСК, полученных в разных лабораториях, и облегчения обмена данными между исследователями Международное общество клеточной терапии (The International Society for Cellular Therapy (ISCT)) в 2006 году предложило минимальные критерии для установления принадлежности клеток к МСК: наличие адгезивных свойств в стандартных условиях культивирования; экспрессия поверхностных молекул CD105, CD73 и CD90 и отсутствие экспрессии CD45, CD34, CD14 или CD11, CD79 или CD19 и HLA-DR; способность к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлении *in vitro* [5].

В тоже время МСК, выделенные из различных тканей, могут отличаться потенциалом к дифференцировке [6].

В настоящее время многие группы исследователей экспериментально подбирают и оценивают эффективность различных ростовых факторов и их комбинаций для хондрогенной дифференцировки МСК. TGF $\beta$  является основным ростовым фактором для стимуляции хондрогенеза в условиях как *in vivo*, так и *in vitro*. В большинстве работ применяется комбинация TGF $\beta$  с другими цитокинами (IGF, BMP, FGF, дексаметазон и т. д.).

Целью нашего исследования было сравнение уровня экспрессии хондрогенных маркеров в недифференцированных МСК, полученных из костного мозга и плаценты, с целью выбора ис-

точника МСК для дальнейшего применения в репаративной медицине, а также оценка влияния различных условий индукции клеток на хондрогенную дифференцировку МСК костного мозга.

**Объект и методы исследований.** В качестве объекта исследований использовались культуры МСК, полученные из костного мозга (КМ-МСК) и из плаценты (П-МСК). Клетки в культурах обладали фенотипом, характерным для МСК (более 95 % клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD90, CD105 и CD73 антигены и менее 2 % клеток, несущих CD45, CD14 и CD34 антигены).

Получение КМ-МСК. Для получения МСК мононуклеарные клетки выделяли из проб костного мозга на гистопакетной плотностью 1,077 г/мл (Sigma, США), отмывали в 0,9 %-ном NaCl (ОАО «Несвижский завод медицинских препаратов», Беларусь), ресуспендировали в IMDM (Life technologies, США) с 10 %-ной эмбриональной телячьей сывороткой FBS (Life technologies, США) и переносили в концентрации  $2-3 \times 10^6$ /мл во флакон с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (Sarstedt, Германия).

Получение П-МСК. МСК из ткани плаценты выделяли ферментативным способом. Фрагменты плаценты смешивали с 0,14 % раствором коллагеназы I (Stem Cell Technologies, Канада) в соотношении 1:1, инкубировали 30 минут при 37°C с последующей инактивацией фермента 10 % FBS (Sigma, США).

КМ-МСК (n=19) и П-МСК (n=11) инкубировали при +37°C и 5 % CO<sub>2</sub> со сменой среды через каждые 3–4 дня. При получении 80–90 % конфлюэнтного слоя МСК дезадгезировали 0,25 %-ным трипсином-ЭДТА (Sigma, США), отмывали в 0,9 % NaCl и переносили во флаконы 25 см<sup>2</sup> в количестве  $0,5 \times 10^6$  для экспансии.

Дифференцировка КМ-МСК и П-МСК в хондрогенном направлении в 2D-культуре. Использовали МСК 2-го или 3-го пассажей, которые культивировали в среде DMEM, содержащей 10 нг/мл TGFβ3 или TGFβ1, 100 нг/мл IGF, 100 нМ дексаметазона, 1 % антибиотика, в течение 7–10 суток. Смену среды проводили на 3–4-й день.

Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР) определяли экспрессию генов *COL2*, *COL1*, *COL10*, *SOX9*, *AGG*, *COL11*, *COMP*, *VER* в образцах КМ-МСК (n = 19) и П-МСК (n = 11). Методом обратной транскрипции проводили синтез комплементарных цепочек ДНК, используя в качестве матрицы выделенную РНК, для чего 1 мкг РНК в концентрации 0,1 мкг/1 мкл воды денатурировали в течение 10 минут при 70°C. Затем аликвоту РНК, охлажденную на льду, вносили в смесь для обратной транскрипции (4 мкл 5 × – кратного буфера для обратной транскриптазы (Promega, США), 2 мкл 10 мМ смеси дезнуклеотидтрифосфатов, 1 мкл 50 мМ случайных праймеров (рэндом гексамеров) (Invitrogen, США), 0,5 мкл ингибитора рибонуклеаз в концентрации 40 Ед/мкл, 1 мкл 200 Ед/мкл обратной транскриптазы MMLV (Promega, США) и 1,5 мкл воды и инкубировали, используя программу: 20°C – 10 минут, 42°C – 45 минут, 99°C – 3 минуты. Разводили ДНК водой до конечного объема 50 мкл. В работе использовали праймеры к исследуемым генам. Дизайн праймеров осуществлялся с помощью онлайн-программ Primer3Plus® (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) и PrimerBlast® (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), таким образом, чтобы они отжигались в наиболее консервативных участках при температуре 60°C. В качестве контрольного гена использовали ген *ABL* и значение экспрессии генов рассчитывали как отношение экспрессии интересующих генов по отношению к контрольному гену *ALB*. В качестве флуоресцентного красителя использовали SYBR Green. Для приготовления реакционной смеси использовали набор QuantiTect SYBR Green PCR Kits (QIAGEN, США). ПЦР проводили как однокомпонентную реакцию (в каждой пробирке праймеры к одной мишени). Условия проведения реакции были следующими: 50°C – 2 мин, 95°C – 15 мин, 94°C – 15 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 30 сек. Анализ специфичности амплификации проверяли по кривым плавления.

Окраска на присутствие щелочной фосфатазы проводилась с использованием набора Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, США). К 1 мл Sodium Nitrite Solution добавляли 1 мл FPV-Alkaline Solution, ресуспендировали и оставляли на 2 минуты. Затем добавляли 45 мл дистиллированной воды и 1 мл Naphthol AS B1 Alkaline Solution. Фиксировали образцы КМ-МСК в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой. Окрашивали образцы в течение 15 мин при 18–26 С в темноте. Промывали дистиллированной водой. Докрашивали гематоксилин-эозином.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ «Statistica» («StatSoft»), США, лицензионный номер продукта STA862D175437Q) и включала методы описательной статистики с определением медианы, 25 и 75 перцентилей, а также методы анализа

для непараметрического распределения: достоверность различий между независимыми выборками оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Для анализа зависимости между показателями применяли коэффициент корреляции Спирмана (Spearman Rank Order Correlations,  $r$ ). При уровне значимости  $p < 0,05$  различия показателей считались достоверными. На стадии планирования эксперимента было определено, что для получения мощности исследования равной 80 % (при  $p < 0,05$ ) объем выборки должен составлять не менее 10 образцов.

**Результаты исследования и обсуждение.** Экспрессия генов-маркеров хондрогенеза в МСК. Была проанализирована экспрессия основных генов, отвечающих за программу хондрогенеза: в качестве маркеров гиалиноподобной хрящевой ткани исследовали гены *COL2A*, *COL11* и *SOX9*, маркера волокнистого хряща – *COL1*, маркера гипертрофии хондроцитов – *COL10* и маркеров синтеза протеогликанов – *AGG*, *COMP*, *VER*.

Нами установлено, что уровень экспрессии *COL1* в 2 раза, *SOX9* в 10 раз, *AGG* в 180 раз, *COMP* в 170 раз выше в КМ-МСК, чем в П-МСК. В свою очередь П-МСК более сильно экспрессируют *COL2* и *COL10*, уровень которых в 20 и в 90 раз соответственно выше, чем в КМ-МСК. Разница в экспрессии *COL11* и *VER* в обоих МСК не наблюдалась (таблица 1).

Таблица 1 – Относительный уровень экспрессии в недифференцированных КМ-МСК и П-МСК

Ген	КМ-МСК (n = 19)	П-МСК (n = 11)	P
	Уровень экспрессии, Ме (25 %; 75 %)	Уровень экспрессии, Ме (25 %; 75 %)	
<i>COL2</i>	0,0001 (0,0001–0,0005)	0,002 (0,001–0,004)	0,0002
<i>COL1</i>	386,68 (152,22–652,58)	193,34 (48,22–330,84)	0,025
<i>COL10</i>	0,001 (0,0004–0,01)	0,09 (0,02–0,21)	0,005
<i>SOX9</i>	0,31 (0,28–0,99)	0,03 (0,002–0,08)	0,00001
<i>AGG</i>	0,90 (0,33–2,19)	0,005 (0,003–0,02)	0,00001
<i>COL11</i>	0,01 (0,01–0,03)	0,02 (0,01–0,03)	0,76
<i>COMP</i>	1,38 (0,51–4,76)	0,01 (0,002–0,03)	0,000001
<i>VER</i>	6,59 (0,16–22,32)	3,66 (2,69–7,21)	0,55

Полученные нами данные частично согласуются с результатами исследований Е. Muñoz-López и соавт., которые проводили заселение носителя недифференцированных КМ-МСК и МСК, полученных из амниона плаценты. Через 8 недель с помощью иммуногистохимического анализа была проведена оценка уровней коллагенов II и I типов для обоих МСК, которая показала, что синтез коллагена II типа в МСК плацентарного происхождения выше, чем в КМ-МСК, тогда как КМ-МСК более активно синтезировали коллаген I типа [7].

В своем исследовании мы наблюдали для П-МСК высокую корреляцию экспрессии *COL2* с экспрессией *AGG* ( $r = 0,8$ ;  $p = 0,0004$ ), *COL11* ( $r = 0,79$ ;  $p = 0,002$ ), *COMP* ( $r = 0,60$ ;  $p = 0,029$ ), тогда как в КМ-МСК корреляция между экспрессией *COL2* и экспрессией аналогичных генов слабая: *AGG* ( $r = 0,4$ ;  $p = 0,045$ ), *COL11* ( $r = 0,45$ ;  $p = 0,03$ ) и *COMP* ( $r = 0,54$ ;  $p = 0,011$ ). Для КМ-МСК установлена положительная корреляция между уровнем экспрессии *COL2* и *COL10* ( $r = 0,69$ ;  $p = 0,0005$ ), которая отсутствовала в П-МСК, тогда как в П-МСК наблюдалась положительная взаимосвязь между *COL11* и *COL10* ( $r = 0,66$ ;  $p = 0,038$ ). Известно, что присутствие положительной корреляции между *COL2* (или *COL11*) и *COL10* является негативным моментом, так как способствует приобретению клетками гипертрофического фенотипа.

Проведенное нами исследование показало, что после преддифференцировки МСК в хондрогенном направлении в течение 7 суток в КМ-МСК отмечался по сравнению с П-МСК более высокий уровень экспрессии *COL1* в 4 раза, *SOX9* в 330 раз, *AGG* в 60 раз, *COMP* в 20 раз. В то же время достоверной разницы в экспрессии генов *COL2*, *COL10*, *COL11* и *VER* не наблюдалось (таблица 2)

Таблица 2 – Относительный уровень экспрессии генов-маркеров хондрогенеза в преддифференцированных КМ-МСК и П-МСК

Ген	КМ-МСК (n = 19)	П-МСК (n = 11)	P
	Уровень экспрессии, Ме (25 %; 75 %)	Уровень экспрессии, Ме (25 %; 75 %)	
<i>COL2</i>	0,002 (0,001–0,004)	0,001 (0,0003–0,02)	0,4761
<i>COL1</i>	32,90 (17,88–53,82)	8,63 (7,46–12,38)	0,0012
<i>COL10</i>	0,009 (0,002–0,06)	0,04 (0,02–0,05)	0,0644

Окончание таблицы 2

<i>SOX9</i>	0,66 (0,33–1,14)	0,002 (0,001–0,098)	0,00002
<i>AGG</i>	0,12 (0,06–0,71)	0,002 (0,0002–0,004)	0,00003
<i>COL11</i>	0,04 (0,03–0,11)	0,029 (0,017–0,033)	0,1731
<i>COMP</i>	0,49 (0,19–1,06)	0,025 (0,009–0,05)	0,0002
<i>VER</i>	1,50 (0,93–4,00)	1,11 (0,92–1,54)	0,4083

Таким образом, можно отметить различный профиль экспрессии генов в нативных МСК, полученных из различных источников. Имея различный первоначальный уровень экспрессии генов и их связей, воздействие ростовых факторов будет давать различные результаты после дифференцировки МСК в хондрогенном направлении, некоторые из которых были нами отмечены в более ранней работе [8].

Также различиями в экспрессии генов в нативных МСК и хондрогенно преддифференцированных МСК, полученных из различных источников, можно объяснить противоречивые результаты, полученные в исследованиях по оценке эффективности недифференцированных и преддифференцированных МСК в восстановлении хряща. Так, использование преддифференцированных в хондрогенном направлении КМ-МСК для репарации суставного хряща имеет преимущество перед недифференцированными МСК, так как сопровождается более активным синтезом коллагена II типа, сафранин О-положительных протеогликанов и заполнением дефектов суставной поверхности гиалиноподобной тканью [9]–[12]. С другой стороны, применение недифференцированных МСК перинатального происхождения приводило к более благоприятному восстановлению хряща, чем использование МСК после преддифференцировки в хондрогенном направлении [13].

#### *Влияние ростовых факторов на хондрогенную преддифференцировку КМ-МСК.*

При анализе хондрогенной дифференцировки КМ-МСК ( $n = 3$ ) с применением различных комбинаций ростовых факторов ( $TGF\beta 1/IGF$  и  $TGF\beta 3/IGF$ ) нами было отмечено, что на 4-е сутки дифференцировки при использовании  $TGF\beta 1/IGF$  наблюдается более интенсивный синтез щелочной фосфатазы по сравнению с  $TGF\beta 3/IGF$ . Тем не менее, на 7-е сутки нами не было выявлено разницы в синтезе данного фермента клетками при воздействии как  $TGF\beta 1/IGF$ , так и  $TGF\beta 3/IGF$  (рисунок 1). Объяснением может служить установленный факт, что МСК – гетерогенная популяция клеток, содержащая бипотентные стволовые клетки, 60–80 % из которых обладают остео-хондрогенным потенциалом [14]. Так как изомер  $TGF\beta 1$  является индуктором как остеогенной, так и хондрогенной дифференцировки МСК [15], то при его применении в меньшем количестве клеток включается программа хондрогенеза, в отличие от изомера  $TGF\beta 3$ , который направлено стимулирует включение дифференцировки МСК по хондрогенному пути. Подобное заключение сделал по результатам своего исследования и F. Vary [16].

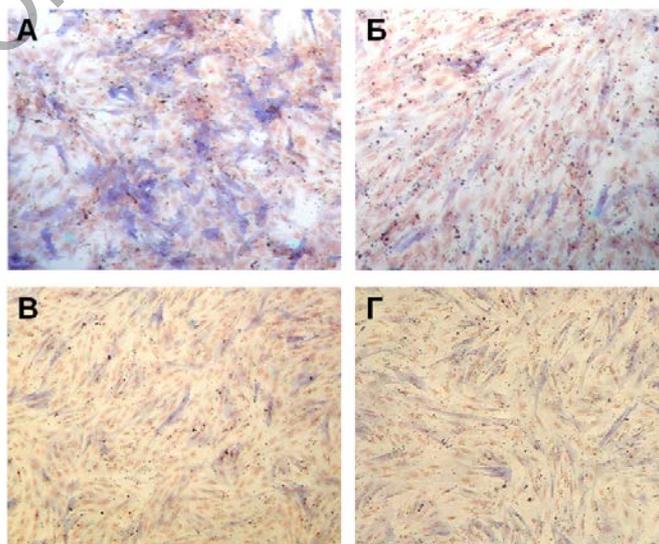


Рисунок 1 – Окраска на щелочную фосфатазу культуры КМ-МСК на 4-е (А, В) и 7-е (В, Г) сутки хондрогенной дифференцировки при применении  $TGF\beta 1/IGF$  (А, В) и  $TGF\beta 3/IGF$  (Б, Г), ( $\times 40$ )

*Морфология МСК при дифференцировке в 2D-системе.* Реализация хондрогенной программы в МСК под влиянием TGF $\beta$ /IGF в 2D-культуре характеризовалась изменением морфологии клеточной культуры. Так МСК, которые до начала дифференцировки представляли монослойную культуру (рисунок 2(A)), после воздействия индукторов хондрогенеза образовывали комплексы в форме очагов или сфероидов (рисунок 2 (Б)), как бы воссоздавая трехмерное микроокружение, подобное тем межклеточным взаимодействиям, которые наблюдаются на стадии конденсации при эмбриональном развитии. Это также было отмечено G.R. Erickson и соавт. [17], но отрицалось Т. Ruhl [18].

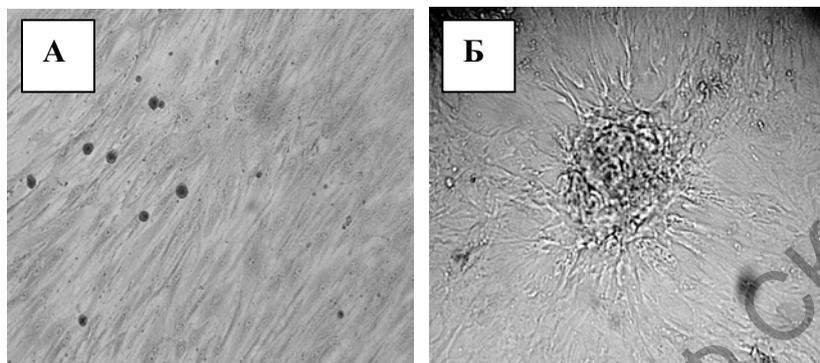


Рисунок 2 – Образование сфероидов в 2D-культуре МСК при хондрогенной дифференцировке ( $\times 100$ ) (А – культура недифференцированных МСК; Б – культура МСК после хондрогенной дифференцировки)

Следует отметить, что в нашем эксперименте не удалось провести длительное культивирование КМ-МСК в 2D-культуре в присутствии ростовых факторов, так как, начиная с 9–10 суток, происходило «скручивание» («заплетание») и открепление монослойной культуры от пластика флакона (планшета) (рисунок 3). Причиной могло быть начало синтеза клетками белков матрикса и их секреции во внеклеточное пространство. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты, полученные другими авторами, которые наблюдали секрецию клетками компонентов внеклеточного матрикса на 14-е сутки дифференцировки [19].

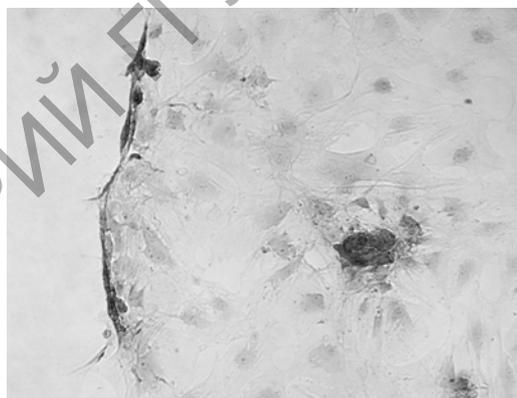


Рисунок 3 – Открепление 2D-культуры от поверхности флакона ( $\times 100$ )

**Заключение.** Полученные нами данные подтверждают различный профиль экспрессии генов-маркеров хондрогенеза в МСК, полученных из костного мозга и ткани плаценты, что требует разного подхода для использования клеток из этих источников для восстановления хрящевой ткани, а именно, проведения предварительной хондрогенной индукции МСК костного мозга в культуре с подбором ростовых факторов и продолжительности индукции до введения в дефект.

### Литература

1. Application of mesenchymal stem cell therapy for the treatment of osteoarthritis of the knee : A concise review / A. T. Wang [et al.] // Review World J Stem Cells. – 2019. – Vol. 11, № 4. – P. 222–235.
2. Potential for osteogenic and chondrogenic differentiation of MSC / A. Lavrentieva [et al.] // Review Adv Biochem Eng Biotechnol. – 2013. – Vol. 129. – P. 73–88.

3. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells / D. Mushahary [et al.] // *Cytometry part A*. – 2018. – Vol. 93, № 1. – P. 19–31.
4. Шахпазян, Н. К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека : биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н. К. Шахпазян, Т. А. Астрелина, М. В. Яковлева // *Гены & Клетки*. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 23–33.
5. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytotherapy* – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315–317.
6. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units : cord is different from blood / M. Secco [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2009. – Vol. 5. – P. 387–401.
7. Human Amniotic Mesenchymal Stromal Cells as Favorable Source for Cartilage Repair / E. Muiños-López [et al.] // *Tissue Engineering Part A*. – 2017. – Vol. 3, № 17-18. – P. 901–912.
8. Жерносеченко, А. А. Хондрогенный и остеогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и плаценты / А. А. Жерносеченко, Я. И. Исайкина, Т. В. Филипович, Е. Г. Лях // *Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 36–44.
9. Matrix-Associated Implantation of Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Versus Articular Chondrocytes : In Vivo Results of Cartilage Repair After 1 Year / B. Marquass [et al.] // *The American journal of sports medicine*. – 2011. – Vol. 39, № 7. – P. 1401–1412.
10. Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model / M. Zscharnack [et al.] // *Am J Sports Med.* – 2010. – Vol. 38. – P. 1857–1869.
11. Articular Cartilage Repair with Mesenchymal Stem Cells After Chondrogenic Priming : A Pilot Study / T. D. Bornes [et al.] // *Tissue Eng Part A*. – 2018. – Vol. 24, № 9-10. – P. 761–774.
12. Аутотрансплантация мезенхимальных стволовых клеток для регенеративного восстановления повреждений суставного хряща / Д. В. Букач, А. В. Белецкий [и др.] // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук.* – 2015. – № 1. – С. 5–11.
13. Comparison of Undifferentiated Versus Chondrogenic Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood for Cartilage Repair in a Rat Model / Y. B. Park [et al.] // *Am. J. Sports Med.* – 2019. – Vol. 47, № 2. – P. 451–461.
14. Muraglia, A. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model / A. Muraglia, R. Cancedda, R. Quarto // *J. Cell. Sci.* – 2000. – Vol. 113, pt. 7. – P. 1161–1166.
15. Osteogenic commitment of Wharton’s jelly mesenchymal stromal cells : mechanisms and implications for bioprocess development and clinical application [Electronic resource] / R. Cabrera-Pérez [et al.] // *Stem Cell Research a Therapy*. – 2019. – Vol. 10, № 1. – Mode of access : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6883559/pdf/13287\\_2019\\_Article\\_1450.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6883559/pdf/13287_2019_Article_1450.pdf). – Date of access : 10.02.2021.
16. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow : differentiation-dependent gene expression of matrix components / F. Barry [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2001. – Vol. 268, № 2. – P. 189–200.
17. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo / G. R. Erickson [et al.] // *Biochem. a Biophys. Research Communications*. – 2002. – Vol. 290, № 2. – P. 763–769.
18. Ruhl, T. Quantification of chondrogenic differentiation in monolayer cultures of mesenchymal stromal cells [Electronic resource] / T. Ruhl, J. P. Beier // *Analytical Biochemistry*. – 2019. – Vol. 582. – Mode of access : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269719301307?via%3Dihub>. – Date of access : 10.02.2021.
19. Improvement of the chondrocyte-specific phenotype upon equine bone marrow mesenchymal stem cell differentiation : influence of culture time, transforming growth factors and type I collagen siRNAs on the differentiation index [Electronic resource] / T. Branly [at al.] // *Intern. J. of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 2. – Mode of access : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855657/pdf/ijms-19-00435.pdf>. – Date of access : 10.02.2021.