

KHẢO SÁT TÍNH TƯƠNG HỢP SINH HỌC CỦA GIÁ THỂ XƯƠNG XÓP VÔ BÀO

Tô Minh Quân, Trần Gia Bửu, Ngô Thị Hoàng Oanh, Đoàn Nguyên Vũ,
Phan Kim Ngọc, Trần Lê Bảo Hà

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 16 tháng 04 năm 2012)

TÓM TẮT: Xương xốp dị loài là một nguồn mẫu dồi dào trong công nghệ xương, tuy nhiên mảnh ghép dị loài có thể kích thích đáp ứng miễn dịch mạnh. Do đó, chúng tôi tiến hành khử tế bào xương xốp dị loài nhằm thu được giá thể vô bào có tính kháng nguyên thấp. Xương xốp heo ($4 \times 4 \times 3,5 \text{ cm}^3$) được khử tế bào bằng dung dịch acetone hoặc chloroform/methanol (1:1). Tính tương hợp sinh học của giá thể xương xốp vô bào được khảo sát thông qua khả năng dung nạp tế bào máu cuống rốn (UBC) và khả năng gây đáp ứng viêm khi ghép dị loài. Kết quả thu nhận được cho thấy, sau khi xử lý với dung dịch acetone hoặc chloroform, xương xốp được loại bỏ hoàn toàn tế bào. Tế bào UBC bám trên bề mặt giá thể sau 3 ngày nuôi cấy và tiếp tục tăng trưởng cho tới ngày 12. Sau 8 ngày ghép vào cơ thể chuột, giá thể gây ra đáp ứng viêm nhẹ. Các kết quả bước đầu cho thấy giá thể xương xốp vô bào là vật liệu có tiềm năng ứng dụng cao trong công nghệ xương.

Từ khóa: xương xốp, khử tế bào, tương hợp sinh học.

MỞ ĐẦU

Xương xốp là một loại cấu trúc xương bên trong cơ thể. Xương xốp bao gồm những những phiến xương liên kết lẫn nhau tạo thành một khối xương có cấu trúc xốp. Xương xốp thường được tìm thấy tại vị trí đầu các xương dài và chức năng chính của xương xốp là bảo vệ tế bào tủy xương. Trong công nghệ mô xương, xương xốp thường được sử dụng nhằm thay thế phần xương bị mất bởi vì cấu trúc lỗ của xương xốp giúp tăng cường quá trình hình thành mạch máu và sự xâm nhập của tế bào chủ vào mảnh ghép trở nên dễ dàng hơn. Tuy nhiên, hiện nay, xương tự thân và đồng loại đều bị hạn chế chung về mặt số lượng, nguồn mẫu khác loài (từ heo, bò... được nuôi trong các

trang trại) có số lượng dồi dào nhưng có thể kích thích những đáp ứng bất lợi cho cơ thể nhận [3], [7]. Trong hai thập kỷ gần đây, nhiều nhà khoa học trên thế giới tiến hành thử nghiệm phương pháp loại tế bào ra khỏi mô, cơ quan khác loài với mục đích làm giảm đáp ứng miễn dịch mảnh ghép nhưng vẫn bảo toàn cấu trúc, hình dạng ngoài của mô, cơ quan và đảm bảo được nguồn cung cấp mẫu dồi dào trên thị trường^[1]. Kế thừa ý tưởng trên, chúng tôi tiến hành tạo và khảo sát tính tương hợp sinh học giá thể xương xốp vô bào nhằm đánh giá tiềm năng ứng dụng của giá thể xương xốp vô bào trong công nghệ xương.

VẬT LIỆU PHƯƠNG PHÁP**Khử tế bào xương xốp heo [1], [8]**

Xương xốp sau khi thu nhận được cắt thành những khối xương nhỏ ($3,5 \times 4 \times 4 \text{cm}^3$). Khối xương xốp được tiến hành loại máu trong dung dịch Tris-HCl trong sáu giờ. Sau đó, mẫu xương xốp được tiến hành khử khoáng một phần bằng dung dịch HCl 0,6N trong mười lăm phút và khử tế bào bằng dung dịch chloroform/ethanol trong sáu giờ hoặc acetone trong mười bảy giờ. Sau đó, xương xốp được khuấy liên tục trong nước cất 2 lần trong 12 giờ và để khô tự nhiên (lặp lại quy trình 4 lần).

Xương xốp sau khi xử lý được gửi đến bộ môn xét nghiệm trường Đại học Y Dược TP. HCM để nhuộm Hematoxylin và Eosin. Tại đây, khối xương được cắt thành những lát mỏng có bề dày 6 μm và nhuộm với hóa chất Hematoxylin và Eosin (HE). Phương pháp này giúp phát hiện thành phần tế bào còn sót lại trong giá thể sau xử lý. Qua đó, chúng ta xác định hiệu quả khử tế bào của dung dịch chloroform/methanol hoặc dung dịch acetone.

Ngoài ra, giá thể xương xốp sau xử lý còn được gửi tới Viện Kỹ Thuật Nhiệt Đới để xác định cấu trúc xốp bằng kính hiển vi điện tử quét SEM (SEM: Scanning Electron Microscope).

Đánh giá sự tương hợp *in vitro* giá thể sau xử lý

Sự tương hợp *in vitro* được đánh giá thông qua khả năng hỗ trợ sự bám dính và tăng sinh tế bào máu cuống rốn đông lạnh ở P4.

Xác định quy trình cấy tế bào vào giá thể tối ưu [4], [9]

Tế bào máu cuống rốn P4 được cấy vào giá thể bằng phương pháp ly tâm với vận tốc 2000v/ph trong một phút và lặp lại quy trình mười lần. Sau khi tiến hành ly tâm lặp lại hai, bốn, sáu, tám, mười lần, số lượng tế bào sống cấy thành công vào giá thể được xác định gián tiếp thông qua số lượng tế bào sống còn lại trong dung dịch. Từ đó, chúng ta tìm được mốc thời gian ly tâm đưa tế bào vào giá thể xương xốp tối ưu.

Xác định sự bám dính tế bào trong giá thể [2], [5], [6]

Giá thể sau khi cấy tế bào máu cuống rốn được nuôi trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS với 37°C , 5% CO_2 . Sau ba ngày hoặc sáu ngày nuôi cấy, giá thể được tiến hành nhuộm HE nhằm xác định sự bám dính tế bào trong giá thể xương xốp.

Xác định sự tăng sinh tế bào trong giá thể [9]

Sự tăng sinh tế bào trong giá thể được đánh giá bằng phương pháp MTT. Giá thể được cấy tế bào được nuôi trong môi trường DMEM/F12 chứa 10% FBS ở 37°C , 5% CO_2 . Sau ba, sáu, chín, mười hai ngày nuôi cấy, giá thể cấy tế bào được thu nhận và đánh giá bằng phương pháp MTT.

Giá thể cấy tế bào được bổ sung môi trường DMEM/F12 chứa 10% FBS và 0,5 mg/ml MTT trong bốn giờ tại 37°C , 5% CO_2 . Sau bốn giờ, môi trường được hút bỏ và thay thế bằng dung dịch DMSO/ethanol. Sau mười hai giờ, dịch nổi được thu nhận và tiến hành đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 545 nm. Mỗi ngày

tiến hành phương pháp MTT với 3 giếng, thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá sự tương hợp *in vivo* giá thể xương xốp vô bào

Sự tương hợp *in vivo* được đánh giá thông qua phản ứng viêm khi ghép giá thể vào cơ thể chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *Albino* năm tuần tuổi, nặng khoảng 22 g.

Thí nghiệm được chia thành hai nhóm: nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Nhóm thí nghiệm bao gồm những con chuột được ghép giá thể xương xốp vô bào (không chứa bất kỳ loại tế bào nào) dưới da lưng. Nhóm đối chứng bao gồm những con chuột được rạch da lưng và khâu lại nhưng không chứa giá thể. Sau hai, năm, tám ngày ghép, giá thể và huyết thanh chuột được thu nhận với mục đích khảo sát đáp ứng viêm cơ thể chuột mức độ tế bào và mức độ phân tử. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Giá thể được thu nhận từ chuột thí nghiệm được tiến hành nhuộm HE đánh giá hiện tượng viêm như sự xâm nhập tế bào bạch cầu, sự hình

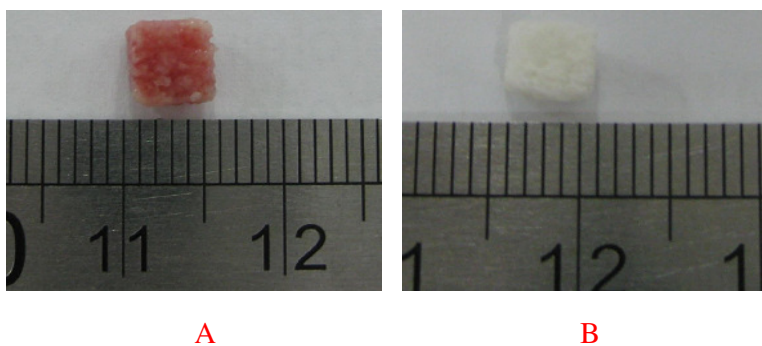
thành mô sợi ... trong giá thể sau các ngày cấy ghép.

Nồng độ các cytokine tiền viêm TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5 trong huyết thanh chuột thí nghiệm và đối chứng được xác định theo phương pháp nhuộm kháng thể miễn dịch huỳnh quang bằng bộ kit BD CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine và theo quy trình do nhà sản xuất cung cấp.

KẾT QUẢ

Kết quả xử lý khối xương xốp

Kết quả quan sát đại thể cho thấy mẫu xương xốp trước khi xử lý có màu đỏ sậm (Hình 1) bởi vì xương xốp có chứa nhiều tế bào hồng cầu, bạch cầu, tế bào xương, tạo cốt bào, huỷ cốt bào. Mẫu xương sau khi xử lý có màu trắng bởi vì thành phần tế bào bên trong đã bị loại bỏ hoàn toàn. Màu trắng này chính là màu tự nhiên của thành phần khuôn nền ngoại bào xương. Kết quả này cho thấy quy trình xử lý đã đạt được thành công ban đầu.



Hình 1. Giá thể trước khi xử lý và sau khi xử lý.(A: trước khi xử lý, B: sau khi xử lý)

Kết quả nhuộm HE cho thấy mẫu đối chứng mang đầy đủ thành phần cơ bản của xương

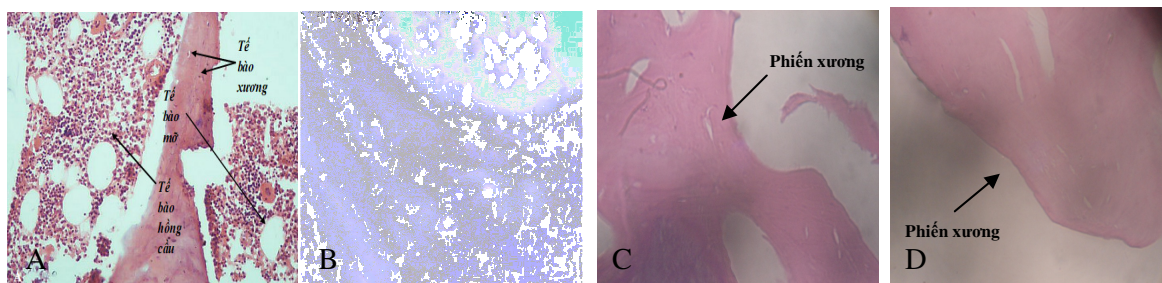
xốp: phiến xương, tế bào máu như hồng cầu, bạch cầu, tế bào xương, tạo cốt bào, huỷ cốt

bào. Ngoài ra, trong một số xương xốp chúng ta còn phát hiện tế bào mỡ (Hình 2).

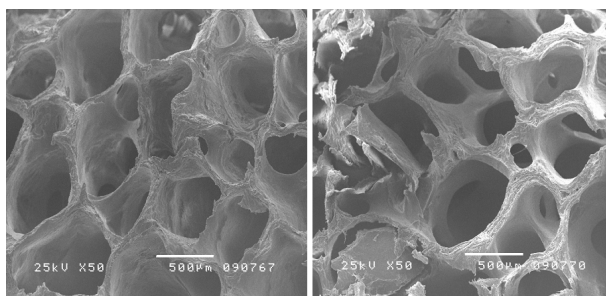
Mẫu khử khoáng vẫn mang đầy đủ thành phần của xương xốp, tuy nhiên thành phần tế bào bị biến dạng. Điều này chứng tỏ HCl làm chết tế bào nhưng không loại tế bào ra khỏi giá thể.

Mẫu xử lý bằng chloroform/metanol hoặc acetone đều khử sạch tế bào, chỉ còn phần xương. Điều này chứng tỏ dung dịch chloroform/metanol hoặc acetone loại bỏ tế bào

một cách hiệu quả. Tuy nhiên, hiệu quả loại tế bào dung dịch acetone cao hơn dung dịch chloroform/metanol, trong một vài mẫu xử lý bằng chloroform/metanol vẫn còn sót vài tế bào trong khi những mẫu xử lý bằng acetone hoàn toàn không có tế bào. Hình ảnh thu nhận từ kính hiển vi điện tử quét (SEM) (Hình 3) cho thấy giá thể tạo ra có cấu trúc xốp và kích thước lỗ dao động trong khoảng từ 300-700µm, khoảng cách giữa các lỗ là 50-100 µm. Cấu trúc này thích hợp cho sự xâm nhập tế bào, mạch máu vào bên trong giá thể.



Hình 2. Giá thể xương xốp. (A: Xương đối chứng, B: Xương khử khoáng, C: Xương khử tế bào bằng chloroform/methanol, D: Xương khử tế bào bằng acetone)



Hình 3. Giá thể xương xốp chụp dưới kính hiển vi điện tử quét

Kết quả đánh giá tương hợp in vitro

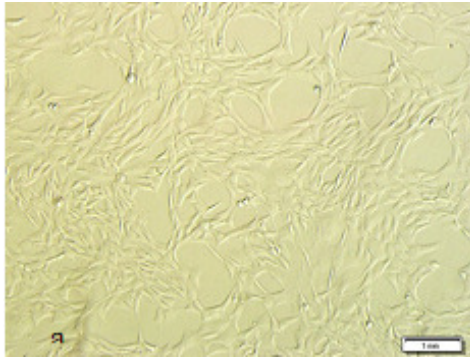
Quy trình cấy tế bào vào giá thể tối ưu

Tế bào máu cuống rốn đã đông ở P4 có hình dạng dài, thon và có khả năng tăng trưởng tốt như trước khi đông lạnh (Hình 4).

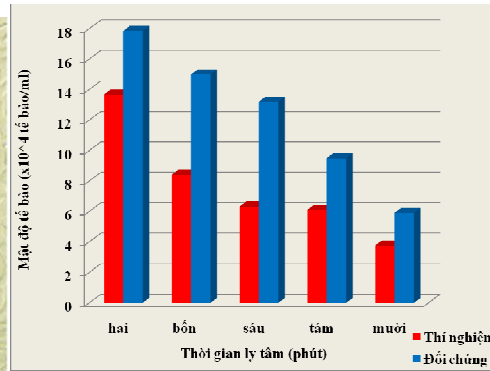
Số lượng tế bào sống cấy thành công vào giá thể được ước tính là sự chênh lệch số lượng tế bào sống giữa nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm. Sự chênh lệch càng cao thì số lượng tế bào sống di chuyển vào bên trong giá thể càng

lớn. Kết quả thu nhận cho thấy sự chênh lệch số tế bào sống giữa đối chứng và thí nghiệm tại các mốc 4, 6 lần là cao hơn các mốc 2, 8, 10 và sự chênh lệch giữa hai mốc 4 và 6 không khác biệt nhau về mặt thống kê (One-way Anova, Turkey Test, $p < 0,05$) (Hình 5). Do đó, chúng ta

xét đến tỉ lệ tế bào chết giữa 2 mốc thời gian trên, kết quả cho thấy, mốc 4 tỉ lệ chết tế bào thấp hơn, điều này phù hợp giả thuyết thời gian ly tâm tỉ lệ nghịch với sức sống tế bào. Do đó, ly tâm 2000v/ph trong 1 phút, lặp lại 4 lần là quy trình cấy tế bào vào giá thể tối ưu.



Hình 4. Tế bào máu cuống rốn rã đông tại P4.

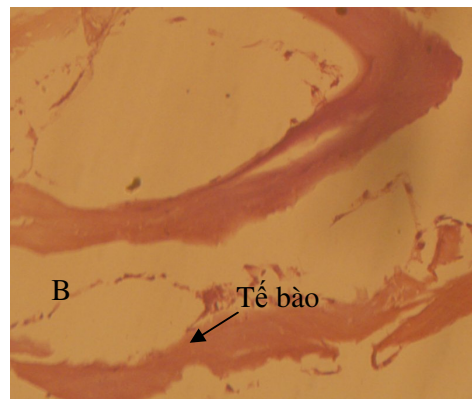
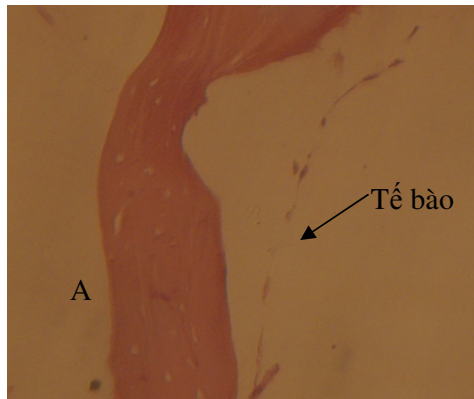


Hình 5. Số lượng tế bào sống còn lại sau khi ly tâm

Sự bám dính tế bào trên giá thể xương xốp vô bào

Kết quả nhuộm mô học cho thấy tế bào máu cuống rốn bám trên bề mặt giá thể xương xốp sau 3 ngày cấy vào giá thể. Tế bào bám trên phiến xương có dạng trải (Hình 6). Trên nhiều vị trí, các tế bào máu cuống rốn liên kết với nhau hình thành một dãy. Đến ngày thứ 5, sự

hiện diện tế bào trên bề mặt phiến xương đã trở nên dày đặc hơn và sự liên kết giữa các tế bào cũng rõ ràng hơn. Điều này góp phần khẳng định tế bào máu cuống rốn có khả năng bám trên giá thể xương xốp khử tế bào. Ngoài ra, kết quả này phần nào chứng tỏ sự tăng trưởng tế bào máu cuống rốn trên giá thể xương xốp.



Hình 6. Tế bào máu cuống rốn được cấy vào giá thể (nhuộm HE). A: Sau 3 ngày, B: Sau 6 ngày.

Sự tăng trưởng tế bào trên giá thể xương xốp vô bào

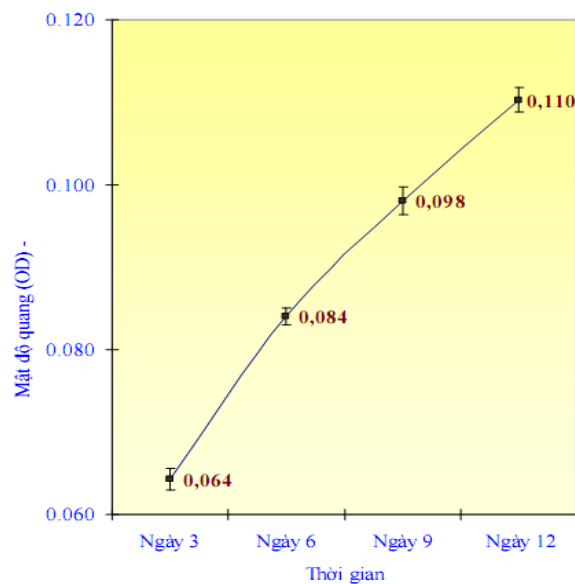
MTT (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide) là một loại tetrazole có màu vàng. Trong tế bào sống, MTT được chuyển hóa thành tinh thể formazan màu tím dưới tác dụng enzyme succinate dehydrogenase của ti thể. Số lượng tế bào càng lớn sẽ tạo ra lượng formazan càng nhiều, giá trị OD dung dịch formazan càng cao.

Nhìn chung, đồ thị giá trị OD qua các ngày thí nghiệm (Hình 7) có dạng đường thẳng đi lên sau 12 ngày nuôi cấy. Mật độ quang của

dung dịch hòa tan ngày 6 cao hơn ngày 3, ngày 9 cao hơn ngày 6, ngày 12 cao hơn ngày 9 (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê). Điều này chứng tỏ tế bào máu cuống rốn có khả năng tăng trưởng trên bề mặt xương xốp vô bào trong 12 ngày sau nuôi cấy. Mật độ quang dung dịch hòa tan ngày 12 cao hơn ngày 3 gấp 1,72 lần. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của các tác giả khác. Những tác giả này thử nghiệm sự tăng trưởng tế bào tủy xương người trên xương khừ khoáng. Các kết quả đã chứng minh rằng sau 14 ngày, tế bào tủy xương tăng 1,9 lần so với ban đầu.

Bảng 1. Giá trị OD thu nhận được qua các ngày thí nghiệm

Giá trị OD	Ngày 3	Ngày 6	Ngày 9	Ngày 12
Trung bình	0,063	0,084	0,098	0,1103
Sai số chuẩn	0,0013	0,001	0,0017	0,0015
Thống kê	A	B	C	D



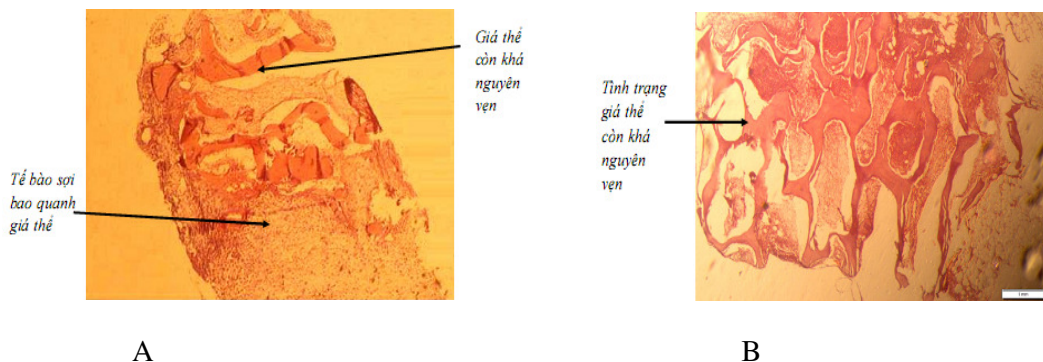
Hình 7. Giá trị OD thu nhận theo các mốc thời gian

Kết quả đánh giá tương hợp *in vivo*

Kết quả mô học

Quan sát bước đầu cho thấy cả hai lô chuột thử nghiệm và đối chứng đều sống khỏe mạnh

cho đến ngày thí nghiệm, hiện tượng chuột chết không xảy ra trong quá trình thí nghiệm. Điều này là một kết quả khả quan ban đầu cho thấy giá thể không gây ảnh hưởng lên sự sống tế bào.



Hình 8. Kết quả nhuộm mô học HE giá thể trong cơ thể chuột. A: Giá thể sau 5 ngày cấy ghép, B: Giá thể sau 8 ngày cấy ghép

Sau 2 ngày ghép giá thể, vị trí cấy ghép bắt đầu lành hóa và không còn hiện tượng sưng đỏ. Giá thể vẫn được bảo toàn, không xuất hiện hiện tượng hư hỏng giá thể. Tế bào sợi bám xung quanh mô ghép nhưng không phát hiện sự xâm nhập các tế bào đại thực bào, lympho bào và mạch máu trong mô ghép.

Ngày thứ 8, mạch máu hình thành, các điểm calci hóa không tăng thêm so với ngày 5. Tuy nhiên, các đại thực bào, tế bào lympho vẫn tồn tại trong giá thể. Từ những kết quả trên cho thấy giá thể vô bào gây ra đáp ứng viêm nhẹ trong cơ thể chuột sau 8 ngày cấy ghép.

Đến ngày 5, xung quanh giá thể bắt đầu xuất hiện các điểm vôi hóa. Một số đại thực bào, tế bào lympho và cấu trúc giống mạch máu xuất hiện xung quanh mô ghép.

Kết quả xác định nồng độ cytokine

Bảng 2. Kết quả xác định nồng độ cytokine huyết thanh chuột qua các ngày thí nghiệm

Nồng độ cytokine (pg/ml)	Ngày 2		Ngày 5		Ngày 8	
	ĐC	TN	ĐC	TN	ĐC	TN
TNF α	50,77	40,56	52,57	41,01	146,13	36,06
IFN γ	46,72	51,33	55,84	252,3	15,07	14,98

IL-5	<=10	25,2	14,11	46,2	16,69	23,98
IL-4	<=10	<=10	<=10	<=10	<=10	<=10
IL-2	13,4	<=10	11,8	16,1	<=10	<=10

(Giới hạn dò tìm của thí nghiệm là 10 ng/ml)

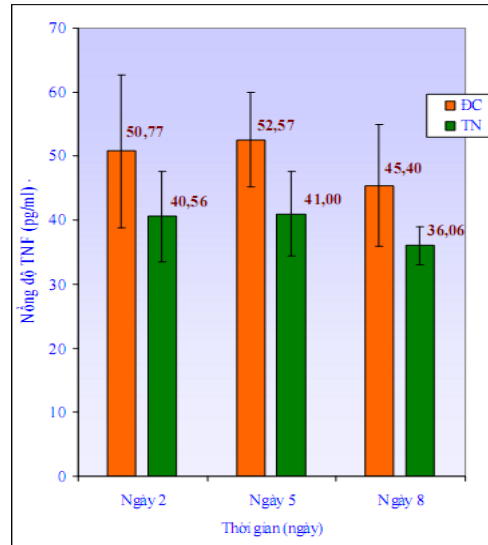
Nhìn chung, nồng độ các loại cytokine trong máu chuột giữa hai lô thí nghiệm và đối chứng không có sự khác biệt đáng kể. Nồng độ các cytokine trong máu chuột đối chứng dao động từ 10-55 pg/ml. Nồng độ cytokine mẫu chuột thí nghiệm đa phần nằm ở mức 15-50 pg/ml. Khi so sánh nồng độ cytokine giữa 2 nhóm thí nghiệm và đối chứng cho thấy nồng độ cytokine giữa 2 nhóm gần giống nhau. Điều này giúp chúng ta có thể kết luận giá thể xương xốp vô bào ít tác động lên sự tiết cytokine trong cơ thể chuột.

Trong quá trình thí nghiệm, năm loại cytokine TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5 được khảo sát. Tuy nhiên, duy nhất một loại cytokine TNF α có đầy đủ số liệu thống kê, các cytokine còn lại rất ít xuất hiện (IL-2, IL-4) hoặc xuất hiện nhiều nhưng không đủ số liệu thống kê (IFN γ , IL-5).

Xét sự gia tăng nồng độ TNF qua các ngày, ta thấy

Nồng độ TNF máu chuột đối chứng giữa ngày 2, 5, 8 không có sự khác biệt về mặt thống kê. Điều này cho thấy những thí nghiệm giữa các ngày có tính đồng nhất và giá trị thu được đáng tin cậy.

So sánh giá trị TNF α giữa nhóm đối chứng và thí nghiệm qua các mốc thời gian 2, 5, 8 ngày cho thấy không có sự khác biệt giữa hai nhóm trên (sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê) trong từng ngày thí nghiệm. Điều này chứng tỏ không có phản ứng viêm được kích thích do giá thể xương xốp vô bào. Tuy nhiên, dựa vào đồ thị ta thấy nồng độ TNF α ngày thứ 5 cao hơn ngày thứ 2 (không có ý nghĩa thống kê). Điều này cho thấy có sự gia tăng đáp ứng viêm vào ngày 5 nhưng sự gia tăng này không đáng kể. Điều này phù hợp kết quả thu nhận được trong đánh giá mô học mảnh ghép giá thể xương xốp vào ngày 5.



Hình 9. Nồng độ TNF qua các mốc thời gian

KẾT LUẬN

Tạo được giá thể vô bào từ xương xốp
Giá thể xương xốp vô bào có khả năng hỗ trợ
quá trình bám dính và tăng sinh tế bào

Giá thể xương xốp vô bào gây ra đáp ứng
viêm nhẹ sau 8 ngày ghép vào cơ thể chuột.

RESEARCH ON BIOCOMPATIBILITY OF CANCELLOUS - DERIVED ACELLULAR SCAFFOLD

To Minh Quan, Tran Gia Buu, Nguyen Thi Hoang Oanh, Doan Nguyen Vu,
Phan Kim Ngoc, Tran Le Bao Ha,
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: Xenogeneic cancellous bone is a abundant resource on bone tissue engineering. But xenograft can arise a serious of immune responses. Thus, we decellularize xenogeneic cancellous bone for obtaining a great number of acellular and low antigenic scaffolds. Porcine cancellous bone (PCB) ($4 \times 4 \times 3,5 \text{ cm}^3$) were decellularized by acetone or chloroform/methanol (1:1). Biocompatibility of acellular scaffold was evaluated by seeding umbilical blood cells (UBCs) into scaffold and transplanting acellular scaffold to xeno-recipient. The result shows that PCB-derived scaffold treated in two decellularizing solutions have no cell. After 3 days, UBCs adhered on surface of scaffold and

proliferated continuously after 12 days. After 8 days, scaffold makes a weak inflammatory response. The initial results show that PCB-derived acellular scaffold can apply in bone tissue engineering.

Key words: cancellous bone, decellularization, biocompatibility.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. G. Liu, J. Sun, Y. Li, H. Zhou, L. Cui, W. Liu, Y. Cao, Evaluation of Partially Demineralized Osteoporotic Cancellous Bone Matrix Combined with Human Bone Marrow Stromal Cells for Tissue Engineering: An In Vitro and In Vivo Stud, *Calcif Tissue Int* 83, 176–185 (2008).
- [2]. I. Drossea, E. Volkmera, R. Capanna, P. D. Biase, W. Mutschlera, M. Schiekera, Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach, *Injury, Int. J. Care Injured* 39S2, S9–S20 (2008).
- [3]. P. Zhang, Z. Hong, T. Yu, X. Chen, X. Jing, Chemical, Structural Properties, and Osteoconductive Effectiveness of Bone Block Derived from Porcine Cancellous Bone, *Biomaterials* 30, 58–70 (2009).
- [4]. M. M. Beloti, P. T. de Oliveira, A. L. Rosa, Seeding Osteoblastic Cells into a Macroporous Biodegradable CaP/PLGA Scaffold by a Centrifugal Force, *Journal of Biomaterials Applications*, 481–495 (2008).
- [5]. N. M. Ocarino, J. N. Boeloni, A. M. Goes, J. F. Silva, U. Marubayashi, R. Serakides, Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition, *Nitric Oxide* 19, 320–325 (2008).
- [6]. S. Hofmann, H. Hagenmuller, A. M. Koch, R. Muller, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, H. P. Merkle, L. Meinel, Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds, *Biomaterials* 28, 1152–1162 (2007).
- [7]. S. Greenwald, S. D. Boden, V. M. Goldberg, Y. Khan, C. T. Laurencin, R. N. Rosier, Bone-graft substitutes: Facts, Fictions and Applications, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 83, 98–103 (2001).
- [8]. U. Kalus, H. Muller, H. Baudisch, Hans-Jurgen Birkhahn, R. von Versen, A. Hansen, A. Pruss, A method for the determination of the residual chloroform in defatted cancellous bone transplants, *Cell and Tissue Banking*, 6, 71–75 (2005).
- [9]. W. T. Godbey, B.S. Stacey Hindy, Matthew E. Sherman, Anthony Atala, A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds, *Biomaterials* 25, 2799–2805 (2004).