

Le cages in "CFRP" favoriscono la replicazione e l'adesione degli osteoblasti rispetto a quelle in "PEEK"

Analisi mediante un modello innovativo per lo studio *in vitro* dei biomateriali

Intersomatic cages made of "CFRP" allow a larger proliferation and replication of the osteoblast cells than the "PEEK" one.

An innovative cellular model for the in vitro study

G. Barbanti-Brodano¹

C. Morelli²

M. Cappuccio¹

C. Di Bona²

A. Gasbarrini¹

M. Tognon²

S. Boriani¹

RIASSUNTO

Le cages intersomatiche utilizzate in chirurgia vertebrale per ottenere un'artrosi intersomatica, costruite con differenti materiali, sono state ampiamente studiate in merito alle proprietà meccaniche, mentre nulla si conosce riguardo alle loro proprietà biologiche di osteogenesi, osteoinduzione ed osteoconduzione. La valutazione di tali caratteristiche necessiterebbe di studi in vivo sull'animale, con tempi lunghi, costi elevati e problemi di ordine etico che le aziende produttrici non sempre possono intraprendere.

Il nostro gruppo ha quindi messo a punto un sistema cellulare che consente la rapida determinazione in vitro dei parametri sopra descritti. Tale sistema è basato sulla linea cellulare Saos-2, una linea di osteosarcoma che mantiene però le proprietà osteoblastiche. La linea è stata ingegnerizzata per verificare *in vitro* la biocompatibilità, la capacità osteogenetica ed osteoconduttiva di due cages intersomatiche costruite in differenti materiali.

I risultati, da considerarsi preliminari, indicano che la cage intersomatica in polimero rinforzato da fibre di carbonio (CFRP) favorisce una maggiore replicazione ed un pattern di distribuzione delle cellule ossee sulla sua superficie più omogeneo rispetto al medesimo impianto costruito in polietereeterchetone (PEEK).

Parole chiave: ingegneria tissutale, marker molecolare osteoblastico, caratterizzazione preclinica

SUMMARY

The mechanical properties of intersomatic cages made of different materials for spine arthrodesis are well known. Instead, their osteogenetic, osteoinductive and osteoconductive properties have not yet been investigated as this would imply long and high-cost animal *in vivo* studies. To better understand the biological features of these implants we developed a new cellular model, suitable for the rapid *in vitro* determination of the above parameters. The cell model derives from a human osteosarcoma cell line, Saos-2, which maintains the cytological features of the osteoblast cells. With this cell line, genetically modified for an *in vitro* study, we tested two different materials for intersomatic cages. Our results suggest that the intersomatic cages made of carbon fibre

¹ Chirurgia Vertebrale, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna.

² Dipartimento di Morfologia ed Embriologia, Cattedra di Biologia Applicata, e Centro di Biotecnologie, Università degli Studi di Ferrara

Indirizzo per corrispondenza:

Dott. G. Barbanti Bròdano,
Chirurgia Vertebrale, Istituti
Ortopedici Rizzoli, Via Pupilli 1,
40136 Bologna. E-mail:
giovanni.barbantibrodano@ior.it

Ricevuto il 10 ottobre 2007

Accettato il 6 novembre 2008

reinforced polimer (CFRP) allow a larger proliferation of the cellular line and a more homogeneous bone cell pattern of distribution than the polietereterechetone (PEEK) one.

Key words: Engineered cell, osteoblast molecular marker, pre-clinical characterization

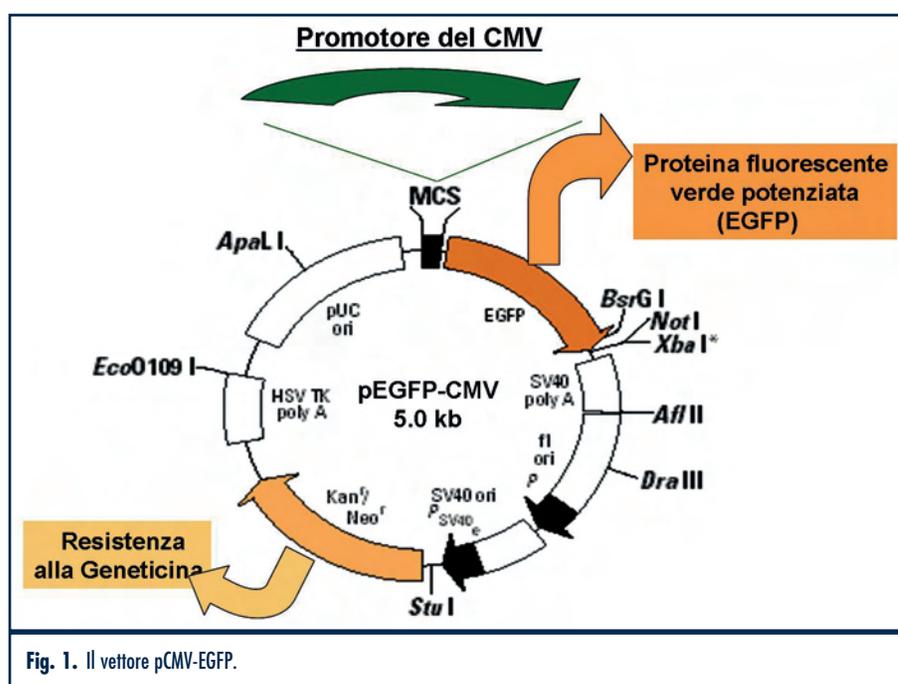
INTRODUZIONE

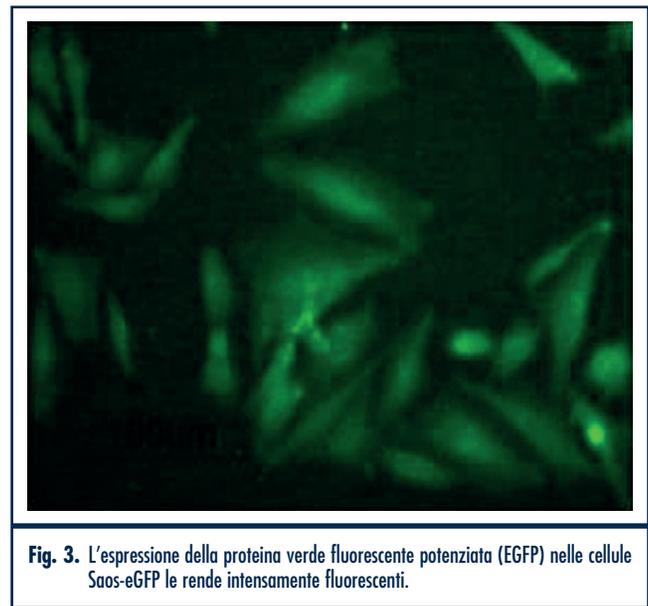
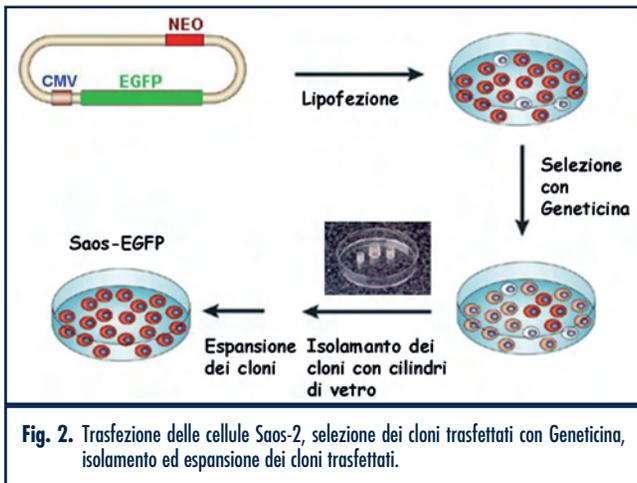
Gli studi pre-clinici sui biomateriali utilizzati in campo ortopedico sono mirati a valutarne la biocompatibilità e le proprietà meccaniche, mentre solo raramente verificano le proprietà biologiche dei materiali stessi; un esempio caratteristico sono le *cages* intersomatiche utilizzate in chirurgia vertebrale per ottenere un'artrosi intersomatica. Costruite con differenti materiali, esse sono state studiate in merito alle proprietà meccaniche dimostrando un modulo di elasticità sempre più vicino a quello della corticale umana¹, mentre nulla si conosce riguardo alla loro proprietà biologiche. La valutazione di tali caratteristiche necessiterebbe di studi in vivo sull'animale, con tempi lunghi, costi elevati e problemi di ordine etico che le aziende produttrici non sempre possono intraprendere. La possibilità di ottenere informazioni sulle proprietà biologiche dei biomateriali mediante studi in vitro di rapida esecuzione ed a basso costo, ovvierebbe a questi problemi, permettendo ai chirurghi di scegliere materiali che offrono un maggiore stimolo alla rigenerazione del tessuto osseo.

In effetti, solo recentemente l'ingegneria dei tessuti si è rivolta a queste problematiche². Inizialmente è stata diretta allo studio di materiali impiantabili che fossero biocompatibili, che non provocassero cioè "reazioni avverse sensibili" nel sito di impianto. Essa è stata più recentemente indirizzata verso lo studio di materiali in grado di stimolare la proliferazione cellulare e, di conseguenza, la rigenerazione del tessuto che essi temporaneamente vengono chiamati a sostituire³. In questo contesto risulta evidente che tali materiali devono consentire la proliferazione e l'attecchimento delle cellule, ma nello stesso tempo non devono influenzare le caratteristiche istologiche delle cellule adese.

MATERIALE E METODI

Il nostro gruppo ha recentemente messo a punto un sistema cellulare che consente la rapida determinazione *in vitro* dei parametri sopra descritti (brevetto depositato N. FI2005A000038). Tale sistema è basato sull'impiego della linea cellulare Saos-2, una linea di osteosarcoma che mantiene però le proprietà osteoblastiche del tessuto di origine⁴. Le cellule Saos-2 sono state transfettate, mediante lipofezione con il reagente commerciale Superfect (Qiagen, Milano, Italia), con 4 μg del vettore pCMV-eGFP⁵ secondo le indicazioni della ditta produttrice. Il vettore pCMV-eGFP contiene il gene per la proteina fluorescente verde potenziata (eGFP) a valle del promotore precoce del Citomegalo virus che ne amplifica l'espressione, ed il gene *Neo* per la resistenza alla Geneticina. A 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state coltivate in presenza di 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di Geneticina (G418 disulfate salt, SIGMA). Dopo due settimane i cloni resistenti sono stati isolati mediante cilindri di vetro, ed espansi come linee cellulari indipendenti (Fig. 1 e 2). Sfruttando il costrutto precedentemente descritto, che garantisce un'elevata espressione del gene esogeno e contiene un marcatore (*Neo*)², abbiamo selezionato gli osteoblasti ingegnerizzati. Cinque cloni sono stati propagati come linee indipendenti, e l'intensità della fluorescenza dovuta al gene esogeno è stata verificata mediante analisi

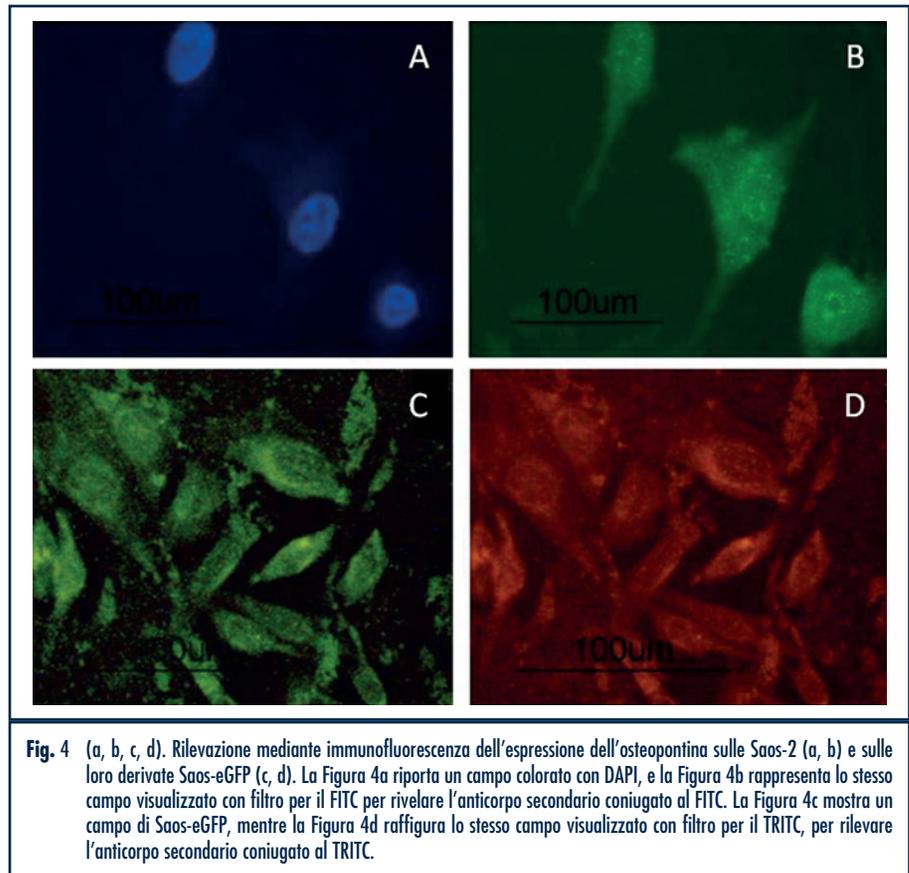




fluorimetrica per un periodo di 6 settimane. Abbiamo così individuato il clone che costantemente presentava la fluorescenza più elevata. Tale clone, indicato come Saos-eGFP è stato oggetto delle indagini successive (Fig. 3). Per verificare se le cellule trasfettate conservassero le caratteristiche istologiche della linea parentale, abbiamo effettuato una caratterizzazione molecolare comparativa sulle Saos-2 e sulle loro derivate Saos-eGFP. L'espressione di proteine specifiche del tessuto osseo, quali l'osteopontina e l'osteocalcina, è stata saggiata mediante immunofluorescenza con anticorpi monoclonali (rispettivamente AKN2A1 e V-19, Santa Cruz Biotechnology, USA) (Fig. 4). Abbiamo inoltre valutato se la presenza della proteina esogena potesse influenzare l'organizzazione citoscheletrica delle cellule, evidenziando con falloidina le fibre di actina (Fig. 5).

Due *cages* utilizzate per realizzare l'artrosi intersomatica in chirurgia vertebrale, una in CFRP ed una in PEEK, insieme ad un cilindro di vetro come materiale di controllo, sono state messe in contatto diretto con le cellule Saos-eGFP coltivate in apposite piastre (Fig. 6). Le *cages* sono state rimosse dalle colture dopo 36 e 84 ore di incubazione, trattate con tripsina per staccare le cellule a loro adese, in seguito contate

mediante analisi fluorimetrica, confrontando i campioni con una curva di calibrazione precedentemente costruita mediante l'analisi di controlli con un numero conosciuto e crescente di cellule.



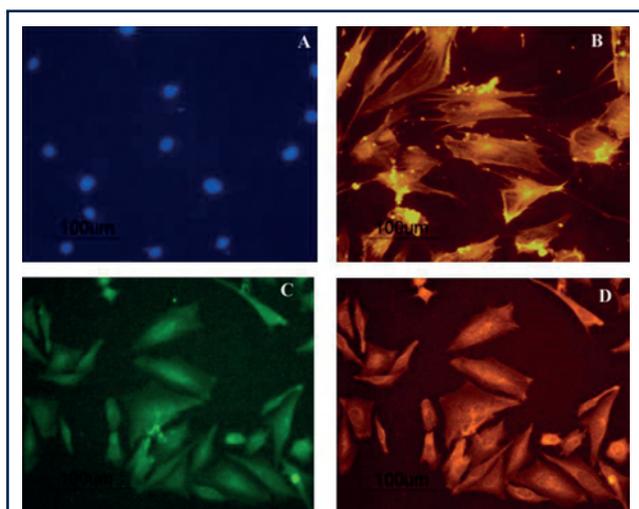


Fig. 5 (a, b, c, d). Rilevazione mediante falloidina tritciata dell'architettura citoscheletrica delle Saos-2 (a, b) e delle loro derivate Saos-eGFP (c, d). La Figura 5a riporta un campo colorato con DAPI, e la Figura 5b rappresenta lo stesso campo visualizzato con filtro per il TRITC per rivelare la falloidina coniugata al TRITC. La Figura 5c mostra un campo di Saos-eGFP, mentre la Figura 5d raffigura lo stesso campo visualizzato con filtro per il TRITC.

Essendo facilmente identificabili al microscopio a fluorescenza anche su materiali opachi, le cellule Saos-EGF sono state osservate direttamente adese alle *cages*, per determinare l'influenza che vari materiali biocompatibili possono esercitare sull'adesione e la disposizione tridimensionale delle cellule sui materiali stessi (Fig. 7).

RISULTATI

La *cage* in *CFRP* favorisce una maggiore induzione alla replicazione ed un *pattern* di distribuzione delle cellule ossee sulla sua superficie più omogeneo rispetto al medesimo impianto costruito in *PEEK* (Tab. I). L'analisi spettrofluorimetrica delle cellule adese alle due *cages* a 36 ore ha mostrato che il *PEEK* induce una maggiore adesività cellulare del *CFRP* (Tab. I). Tenendo conto che il tempo di replicazione delle cellule Saos-eGFP è circa di 38 ore, a 36 ore la maggior parte delle cellule deve ancora completare la prima replicazione, per cui si può assumere che si valutano il numero di cellule cono-



Fig. 6. Le due *cages* in *CFRP* e *PEEK* nelle piastre di coltura insieme ad un frammento di vetro come controllo.

sciuto (150.000) messe in coltura il primo giorno; si può notare che alla *cage* in *PEEK* si sono attaccate un numero di cellule maggiore rispetto alla *cage* in *CFRP*. A 84 ore tutte le cellule hanno completato due repliche: la *cage* in *CFRP* ha quasi raddoppiato il numero di cellule adese, mentre il numero di cellule adese alla *cage* in *PEEK* è solo minimamente aumentato (Tab. I).

L'osservazione delle cellule Saos-eGFP mediante microscopio a fluorescenza rovesciato consente di valutare tali cellule direttamente sui materiali su cui sono adese; ciò è reso possibile dalla alta fluorescenza costitutiva acquisita dalle cellule dopo la trasfezione della proteina verde fluorescente potenziata (eGFP), che permette di riconoscere ed analizzare distintamente le cellule rispetto ai bioma-

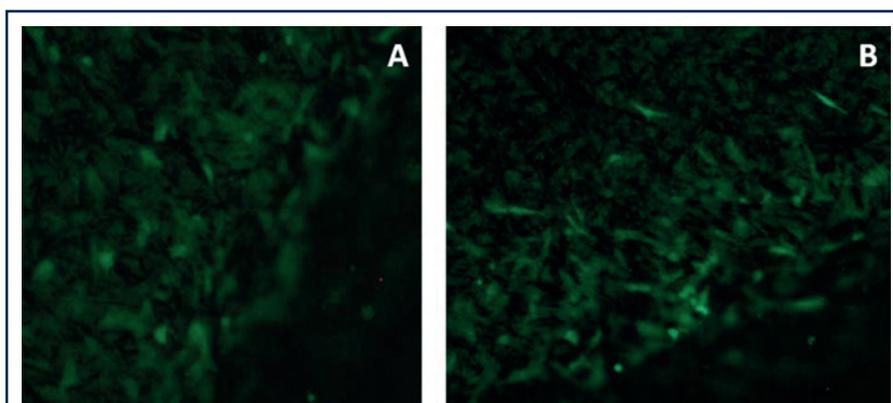


Fig. 7. Visualizzazione diretta mediante microscopia rovesciata a fluorescenza delle cellule Saos-eGFP adese alle *cages*. Nella Figura 7a le cellule sono adese ad una gabbietta in *CFRP*, mentre nella Figura 7b il biomateriale è rappresentato da *PEEK*. Nella fig. 7a le cellule sono adese ad una gabbietta in *CFRP*, mentre nella fig. 7b il biomateriale è rappresentato da *PEEK*.

Tab. I. Valori spettrofluorimetrici espressi in O.D. delle cellule cresciute sulle cages esaminate e percentuali relative di incremento del numero delle cellule rispetto al controllo vetro a 36 ore.

Vetro (controllo)	Cage in carbonio	Cage in PEEK
36 ore	65.392,75	(100%)
	75.731,52	(116%)
	79.350,09	(121%)
84 ore	74.180,71	(13%)
	115.794,3	(53%)
	89.430,4	(13%)

teriali, anche se opachi. Tale analisi ha mostrato che le cellule hanno un *pattern* di distribuzione differente sulle due cages studiate; mentre sulla cage in PEEK la cellule si distribuiscono in assetto disomogeneo, a grappolo, su quella in CFRP esse formano un tappeto di cellule che colma tutta la superficie del materiale in modo omogeneo (Fig. 7).

La valutazione immunoistochimica dell'espressione delle proteine specifiche del tessuto osseo e l'analisi dell'organizzazione citoscheletrica delle fibre di actina mediante falloidina hanno dimostrato che le cellule Saos-eGFP trasfettate con il vettore pCMV-eGFP non hanno subito alcuna alterazione istologica rispetto alle cellule parentali Saos-2 e possono essere quindi considerate a pieno titolo un modello di cellule osteoblastiche (Figg. 4-5).

DISCUSSIONE

Lo sviluppo della chirurgia ortopedica negli ultimi decenni è stato largamente influenzato dalla introduzione di nuovi materiali da impianto e, contemporaneamente dall'interesse di quella disciplina che si occupa dello studio della loro interazione con il tessuto ospite, l'ingegneria dei tessuti. Essa rappresenta la sintesi delle conoscenze biologiche, molecolari e biomeccaniche sui materiali impiantabili; in principio si è rivolta alla verifica della biocompatibilità degli stessi, più recentemente, la necessità di utilizzare materiali che favorissero la rigenerazione del tessuto osseo nel sito di impianto, ha indirizzato gli studi verso l'analisi delle proprietà biologiche dei biomateriali.

L'artrosi o fusione è uno degli obiettivi principali nella maggior parte degli interventi di chirurgia vertebrale rivol-

ti alla cura primariamente della patologia degenerativa, ma anche di quella traumatica, infettiva ed oncologica. Inizialmente, per raggiungere tale scopo, si impiegava esclusivamente osso autologo; in seguito si è ricorso all'uso di osso eterologo ed omologo, al fine di accorciare i tempi chirurgici, ridurre le perdite ematiche e le complicanze legate al prelievo dell'innesto. L'introduzione delle cages intersomatiche ha rivoluzionato la chirurgia vertebrale. Offrendo proprietà meccaniche migliori di qualsiasi precedente innesto osseo e permettendo di ottenere, mediante un'artrosi intersomatica, una corretta distribuzione dei carichi sulle tre colonne del rachide ed un ripristino del *balance* sagittale, il loro impiego ha ridotto in modo importante le percentuali di pseudoartrosi riscontrate con le precedenti tecniche chirurgiche e con l'utilizzo degli innesti ossei intersomatici⁶⁻⁸. Come per la maggior parte dei materiali utilizzati in ortopedia, studi preclinici sono stati condotti sulle proprietà meccaniche delle cages intersomatiche, dimostrando, con l'evoluzione dei materiali, una sempre maggiore affinità all'elasticità dell'osso umano (1), caratteristica che ne ha migliorato l'incorporazione nel sito ospite, ma nessuno studio *in vitro* compare in letteratura ad oggi che ne valuti le proprietà biologiche. Tali caratteristiche sono state analizzate solo *in vivo* sull'animale^{9,10}, oppure in studi clinici indirettamente, mediante la valutazione radiografica dell'artrosi ottenuta nella serie di pazienti trattati¹¹⁻¹⁴, richiedendo tempi di analisi molto lunghi, costi elevati e problematiche di ordine etico correlate agli studi sugli animali e sui pazienti che in molti paesi sono limitati dalla legislazione vigente. Per questi motivi la maggior parte delle industrie produttrici di biomateriali ha intrapreso molto sporadicamente studi sulle loro proprietà biologiche, approfondendo gli studi meccanici che richiedevano tempi più brevi e risultavano più convenienti sul piano economico.

La necessità di una valutazione *in vitro* dell'effetto biologico delle cages intersomatiche sul tessuto ospite ha indotto il nostro gruppo a mettere a punto un sistema cellulare che consente la rapida determinazione *in vitro* dei parametri sopra descritti. Tale sistema è basato sulla linea cellulare Saos-2, una linea di osteosarcoma che mantiene però le proprietà osteoblastiche. Tale linea ingegnerizzata è stata creata per verificare *in vitro* la biocompatibilità, la capacità osteoconduttiva e le proprietà osteogenetiche delle cages intersomatiche. Queste cellule infatti mantengono le caratteristiche istologiche tipiche degli osteoblasti^{15,16} ed inoltre possiedono una capacità proliferativa illimitata, che ne consente la propagazione continua *in vitro*. Mediante la

tecnica di lipofezione, tali cellule sono state ingegnerizzate con la porzione codificante per la proteina fluorescente verde potenziata, *enhanced green fluorescent protein* (eGFP)¹⁷. È questa la forma potenziata, ottenuta per mutagenesi, della GFP parentale isolata dalla medusa *Aequorea victoria*. Il gene per la eGFP garantisce l'espressione della proteina fluorescente anche in sistemi cellulari eterologhi, senza indurre nessun tipo di tossicità¹⁷. Il nostro studio ha dimostrato inoltre che la presenza della proteina eterologa non influisce sulla normale espressione dei marcatori molecolari tipici del tessuto osseo. Infatti, esse mantengono inalterate le caratteristiche morfologiche ed istologiche delle cellule di origine (Figg. 4 e 5). La linea cellulare Saos-eGFP da noi ingegnerizzata presenta le caratteristiche istologiche tipiche degli osteoblasti umani ed esprime costitutivamente la eGFP.

In due recenti pubblicazioni^{18,19}, gli autori hanno utilizzato la eGFP per transfettare le cellule staminali mesenchimali umane (MSCs); tali cellule fluorescenti sono state utilizzate per valutare principalmente l'osteoinduzione di materiali biocompatibili, quali bioceramici ed idrossiapatite, sia in vitro che dopo impianto in animali da esperimento; tralasciando i risultati specifici riguardanti i materiali in analisi, entrambi gli autori sottolineano il grande valore del modello cellulare impiegato in applicazioni di ingegneria tissutale. L'impiego del modello da noi sviluppato sviluppato si indirizza in modo più specifico alla valutazione dell'osteocostruzione e dell'induzione alla replicazione di cellule ossee mature e all'analisi di come i differenti biomateriali influiscano sulla distribuzione di tali cellule sulle loro superfici. Tale modello applicato alle *cages* intersomatiche costituite da due differenti materiali ha dimostrato una maggiore espressione di tali proprietà nella *cage* in CFRP rispetto a quella in PEEK; in effetti, se ad un primo controllo a 36 ore di incubazione sembrerebbe che un numero lievemente maggiore di cellule sia attaccato alla *cage* in PEEK, dimostrandone una temporanea maggiore osteocostruzione, al controllo a distanza di 84 ore, dopo almeno due replicazioni cellulari, le cellule adese alla *cage* in CFRP è quasi raddoppiato, mentre quelle sulla *cage* in PEEK è solo lievemente aumentato, confermando una più spiccata capacità di indurre replicazione degli osteoblasti ed osteocostruttiva del PEEK. Tali dati sono da considerarsi preliminari, in quanto limitati dalla valutazione temporale, eseguita solo fino a 84 ore; una verifica andrà eseguita in esperimenti al momento in corso, a tempi di incubazione più prolungati.

Le cellule Saos-eGFP da noi sviluppate rappresentano un modello cellulare facilmente identificabile grazie alla

intensa fluorescenza espressa costitutivamente. Questo permette la visualizzazione, con un microscopio rovesciato a fluorescenza, delle cellule anche su materiali opachi, sui quali non è possibile la visualizzazione in campo bianco. Ciò rappresenta un notevole vantaggio, in quanto permette di determinare l'influenza che vari materiali biocompatibili possono esercitare sull'adesione, la colonizzazione e la disposizione tridimensionale delle cellule sui materiali stessi. Queste informazioni sono particolarmente necessarie per determinare il potenziale di ripristino di un tessuto altamente organizzato, quale il tessuto osseo.

La visualizzazione delle cellule Saos-eGFP sulle due *cages* ha mostrato due modalità di distribuzione differenti delle cellule in base al materiale a cui sono adese. Sulla *cage* in PEEK le cellule si distribuiscono in piccoli raggruppamenti a grappolo, in modo disomogeneo, mentre sulla *cage* in CFRP esse assumono una distribuzione omogenea, a tappeto, confermando che la conformazione del materiale può influire sull'organizzazione tridimensionale delle cellule ad esso adese, forse interagendo nella proliferazione cellulare, soprattutto di un tessuto come quello osseo, dove l'architettura cellulare è così importante.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio, pur se ancora preliminari a da confermare con dati più a lungo termine, dimostrano che le *cages* intersomatiche in CFRP favoriscono la replicazione degli osteoblasti e inducono un *pattern* di distribuzione delle cellule sulla loro superficie più omogeneo rispetto ai medesimi impianti costruiti in PEEK. Le cellule da noi ingegnerizzate possono quindi essere utilizzate per la determinazione *in vitro* dei parametri necessari alla valutazione di alcune proprietà biologiche di materiali biocompatibili. Fino ad oggi queste valutazioni prevedevano l'impiego, in una prima fase, di modelli animali, ed in ultima istanza di volontari umani. Di conseguenza, i tempi necessari per ottenere questi dati risultavano necessariamente molto lunghi. Inoltre, l'uso di modelli animali ed il reclutamento di volontari umani pone seri problemi di ordine etico. Il nostro modello cellulare si presenta come una valida alternativa all'utilizzo di queste risorse scientifiche, permettendo di ottenere dati sperimentali totalmente attendibili in esperimenti *in vitro*, consentendo di ridurre i tempi, i costi e di eliminare qualsiasi problema di tipo etico.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Abu Bakar MS, Cheng MH, Tang SM, Yu SC, Liao K, Tan CT, et al. *Tensile properties, tension-tension fatigue and biological response of polyetheretherketone-hydroxyapatite composites for load-bearing orthopedic implants*. *Biomaterials*. 2003;24):2245-50.
- ² Langer R, Tirrel DA. *Designing materials for biology and medicine*. *Nature* 2004;428:487-92.
- ³ Kokubo T, Kim HM, Kawashita M, Nakamura T. *Bioactive metals: preparation and properties*. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:99-107.
- ⁴ Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. *Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. *Gene* 1992;111:229-33.
- ⁵ Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. *Engineering bone: challenges and obstacles*. *J Cell Mol Med* 2005;9:72-84.
- ⁶ Barbanti Brodano G, Donati U, Palmisani M, Pompili M, Boriani S. *Posterior lumbar interbody fusion a mid-term review of 60 cases*. *Chir Organi Mov* 2000;85:345-60.
- ⁷ Steffee AD, Sitkowitz DJ. *Posterior lumbar interbody fusion and plates*. *Clin Orthop* 1988;227:99.
- ⁸ Weiner BK, Fraser RD. *Spine update lumbar interbody cages*. *Spine* 1998;23:634-8.
- ⁹ Boden SD, Martin GJ Jr, Horton WC, Truss TL, Sandhu HS. *Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage*. *J Spinal Disord* 1998;11:95-101.
- ¹⁰ Zou X, Li H, Bunger M, Egund N, Lind M, Bunger C. *Bone ingrowth characteristics of porous tantalum and carbon fiber interbody devices: an experimental study in pigs*. *Spine J* 2004;4:99-105.
- ¹¹ Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, Heim SE. *The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report*. *Spine* 2000;25:376-81.
- ¹² Burkus JK, Dorchak JD, Sanders DL. *Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2*. *Spine* 2003;28:372-7.
- ¹³ Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH, Watkins RG, Balderston RA. *Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2*. *Spine* 2002;27:2396-408.
- ¹⁴ Haid RW Jr, Branch CL Jr, Alexander JT, Burkus JK. *Posterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2 with cylindrical interbody cages*. *Spine J* 2004;4:527-38.
- ¹⁵ Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. *Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties*. *Cancer Res* 1987;47:4961-6.
- ¹⁶ Shupnik MA, Tashjian AH Jr. *Epidermal growth factor and phorbol ester actions on human osteosarcoma cells*. *J Biol Chem* 1982;257:12161-4.
- ¹⁷ Cormack BP, Valdivia R, Falkow S. *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. *Gene* 1996;173:33-8.
- ¹⁸ Ge Z, Bagueard S, Lim L.Y, Wee A, Khor E. *Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes*. *Biomaterials* 2004;25:1049-58.
- ¹⁹ Xia Z, Ye H, Locklin RM, Fergusin DJ, Cui Z, Triffitt J. *Efficient characterization of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells*. *Biomaterials* 2005;26:5790-800.