



## **Badania wstępne nad zastosowaniem alginianu do przeszczepiania chondrocytów w ścianę pęcherza moczowego szczura**

Tomasz Drewa<sup>1,2</sup>, Zbigniew Wolski<sup>1</sup>, Przemysław Gałązka<sup>2</sup>, Jan Sir<sup>3</sup>, Alina Woźniak<sup>2</sup>, Artur Czaplewski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Urologii, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, Bydgoszcz

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii Medycznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera, Bydgoszcz

<sup>3</sup>Zakład Patomorfologii Nowotworów, Centrum Onkologii im. F. Łukaszczyka, Bydgoszcz

### **Preliminary study on alginate scaffold application for chondrocytes transplantation into the rat bladder wall**

#### **Summary**

Cultured chondrocytes seeded on appropriate scaffold can be used in treatment of vesico-urethral-reflux.

Aims: influence of alginate scaffold on extracellular matrix production by rats chondrocytes. Observation of alginate degradation in rat bladder.

Differentiated chondrocytes were seeded onto alginate fibers and alginate gel beads and stained with alcian blue. Alginate was injected in bladder wall of 10 rats with following histological examination (H+E and alcian blue). Chondrocytes became round on alginate fibers and glycosaminoglycane positive in alginate beads. Volume of the implanted alginate decreased after 8<sup>th</sup> week. Alginate gel allows chondrocytes to reexpress phenotype.

#### **Key words:**

cultured chondrocytes, alginate, vesico ureteral reflux, rats.

#### **Adres do korespondencji**

Tomasz Drewa,  
Katedra i Zakład Biologii  
Medycznej,  
Akademia Medyczna  
im. L. Rydygiera,  
ul. Karłowicza 24,  
85-092 Bydgoszcz;  
e-mail:  
tomaszdrewa@wp.pl

## 1. Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa jest nową i szybko rozwijającą się gałęzią medycyny zajmującą się naprawą ludzkich tkanek i organów. Metody inżynierii tkankowej pozwalają na wyhodowanie chrząstki w warunkach *in vitro*. Pierwotne hodowle chondrocytów znajdują zastosowanie w urologii, chirurgii plastycznej, laryngologii i ortopedii (1-10).

Pierwsze kliniczne zastosowanie hodowanych chondrocytów w endoskopowym leczeniu odpływu pęcherzowo-moczowodowego opisali Diamond i Caldamone (11). Endoskopowe leczenie odpływu polega na wstrzyknięciu od 1 do 3 ml substancji w celu zwężenia ujścia moczowodu do pęcherza moczowego. Wytworzony w ten sposób mechanizm zastawkowy nie pozwala na cofanie się moczu z pęcherza do moczowodu i nerki. W wyniku leczenia zawiesiną chondrocytów w alginianie (polisacharyd z alg brunatnych) po roku obserwowano 70% remisję odpływów (2). Odsetek wyleczonych chorych był porównywalny z wyleczeniami za pomocą sztucznych materiałów, takich jak teflon, silikon i ostatnio stosowany Deflux-system (12-14). Materiały biologiczne (kolagen, krew, tłuszcz) nie wykazują odpowiedniej trwałości (15). Stosowanie substancji syntetycznych wiąże się z ryzykiem migracji ich fragmentów lub mikrocząstek w organizmie (16,17). Zastosowanie autologicznych chondrocytów pozwala to ryzyko ominąć.

Powodzenie leczenia odpływu pęcherzowo-moczowodowego zależy od fizycznych właściwości substancji wstrzykiwanej w okolicę ujścia pęcherzowego moczowodu w celu wytworzenia zastawki zapobiegającej cofaniu się moczu. Wstrzykiwany materiał musi charakteryzować się odpowiednią trwałością i sprężystością ze względu na zmiany napięcia i grubości ściany pęcherza moczowego podczas gromadzenia moczu i mikcji. Materiał ten nie powinien ulegać przemieszczaniu. Poza trwałością materiał używany do leczenia refluksu powinien być biokompatybilny. Chrząstka (otrzymywana *in vitro*) może być, jak się wydaje, idealnym materiałem autologicznym, który charakteryzuje się wymienionymi cechami. Istnieją jednak pewne przeszkody, które należy pokonać, aby uzyskać odpowiednią ilość dobrego materiału biologicznego. Uzyskanie implantu „neochrząstki” otrzymanej *in vitro* zależy od trzech czynników: dużej liczby komórek, ich zróżnicowania i obecności odpowiedniego podłoża przestrzennego. Wycinek chrząstki pobierany do hodowli jest ubogokomórkowy. Uzyskane od dawcy komórki trzeba intensywnie rozmnożyć. Podczas intensywnej proliferacji *in vitro* komórki ulegają odróżnicowaniu. Kolejnym etapem jest przywrócenie komórkom ich pierwotnego fenotypu co wiąże się z zahamowaniem podziałów komórkowych. Zastosowanie odpowiedniego podłoża przestrzennego przywraca odróżnicowanym chondrocytom ich fenotyp i pozwala na produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Tak przygotowane komórki mogą utrzymać się w ścianie pęcherza moczowego, gwarantując wyleczenie odpływu pęcherzowo-moczowodowego (2,18).

## 2. Cel pracy

Postanowiono ocenić możliwości przywrócenia odróżnicowanym podczas intensywnych podziałów komórkom ich pierwotny fenotyp komórki chrząstki. Badano *in vitro* wpływ podłoża przestrzennego z alginianu na morfologię i produkcję substancji macierzy zewnątrzkomórkowej chondrocytów pochodzących z odróżnicowanej hodowli.

*In vivo* oceniono degradację samego podłoża z alginianu w ścianie pęcherza moczowego szczura pod kątem jego przydatności jako rusztowania dla komórek.

## 3. Materiał i metoda

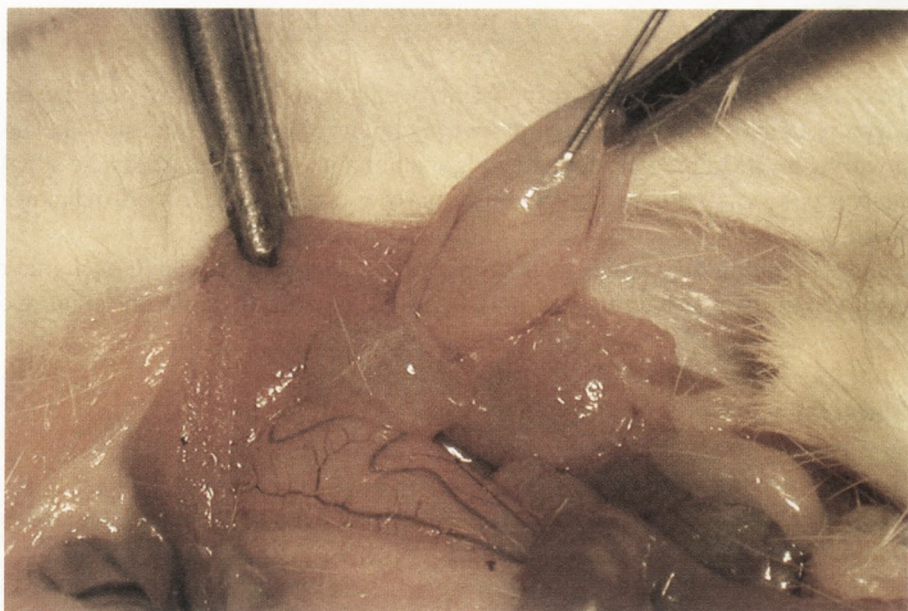
### 3.1. Określenie stopnia degradacji alginianu w ścianie pęcherza moczowego szczura

Doświadczenie przeprowadzono na grupie 10 młodych szczurów. W znieczuleniu ogólnym ketaminą (3 mg/kg m.c., i.v.) po otwarciu jamy otrzewnej wstrzykiwano szczurom w boczną ścianę pęcherza moczowego zestalony alginat (pośredniej lepkości, Sigma) o objętości do 250  $\mu$ l (fot. 1). Zestalenie wykonywano poprzez zawieszanie kropeł 1% alginianu w roztworze  $\text{CaCl}_2$  (102 mM) przez 5 minut. Po tym czasie widoczne były kulki alginianu o średnicy od 0,2 do 0,4 mm. W celu potwierdzenia efektu zestalenia wykonano preparaty, które zweryfikowano po wybarwieniu hematoksyliną i eozyną oraz błękitem alcjanu.

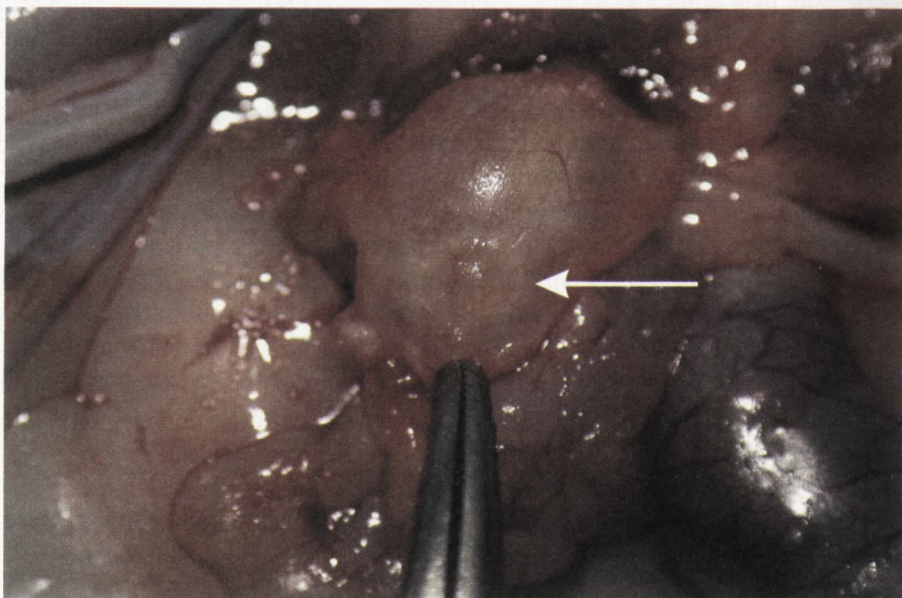
Od 3 tygodnia po podaniu alginianu co tydzień usypiano jednego szczura pobierając pęcherz moczowy do badania histologicznego, w celu oceny ściany w miejscu wstrzyknięcia alginianu. Grupę porównawczą stanowiło 5 szczurów, którym wstrzyknięto w ścianę pęcherza moczowego nie zestalony alginian (bez usieciowania jonami  $\text{Ca}^{2+}$ ). Preparaty w grupie kontrolnej uzyskiwano w tych samych odstępach czasowych co w grupie badanej. Dokonano oceny histologicznej preparatów z użyciem barwienia hematoksyliną i eozyną [H+E] oraz błękitem alcjanu. Mierzono szerokość implantu z alginianu w miejscu gdzie jego przekrój był największy. Wykonano dokumentację fotograficzną.

### 3.2. Zakładanie pierwotnej hodowli chondrocytów rosnących w pojedynczej warstwie

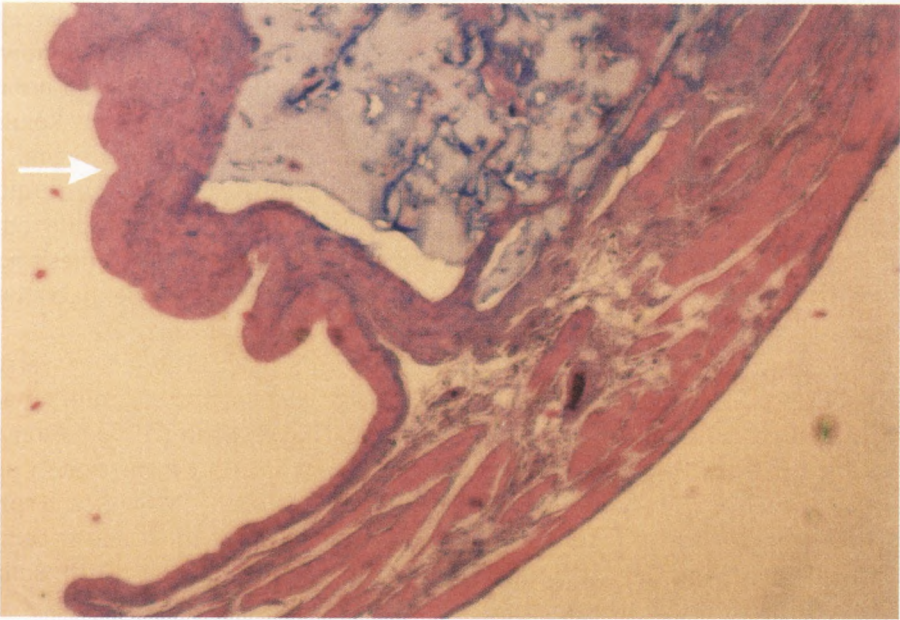
Z ucha szczura pobrano chrząstkę o średnicy ok. 2,5 mm. Tkankę przeniesiono do medium hodowlanego. Do hodowli chondrocytów przygotowano medium ho-



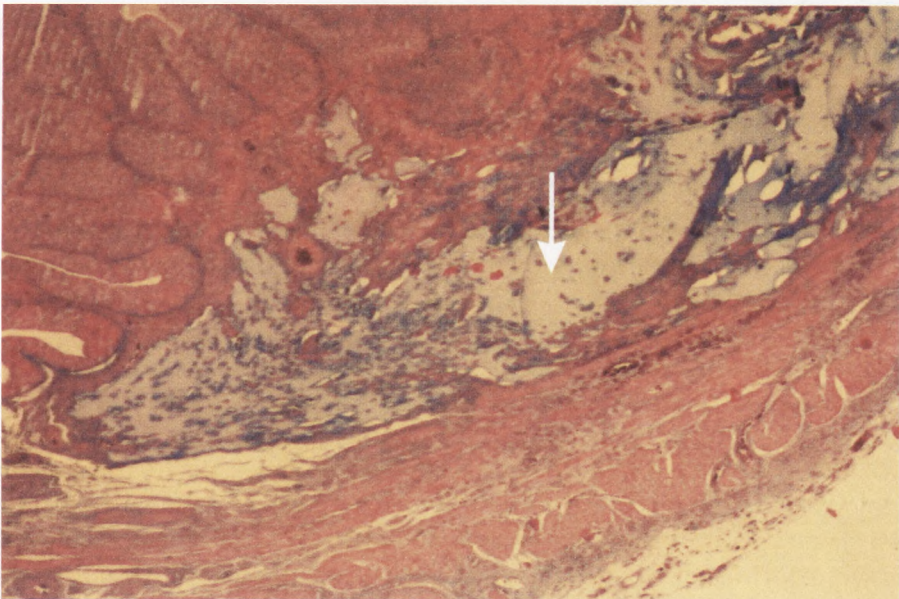
Fot. 1. Iniekcja alginianu w ścianę pęcherza moczowego szczura. Widok śródoperacyjny.



Fot. 2. Pęcherz moczowy szczura po 3 tygodniach od wstrzyknięcia alginianu. Widoczny implant w ścianie bocznej pęcherza moczowego (→). Widok śródoperacyjny.



Fot. 3. Przekrój poprzeczny ściany pęcherza moczowego szczura po 5 tygodniach od podania zestawionego alginianu. Przerost nabłonka pęcherza moczowego (→). W obrębie ściany pęcherza nie stwierdzono odczynu zapalnego (błękit alcjana, pow. 40 ×).



Fot. 4. Przekrój poprzeczny ściany pęcherza moczowego po 8 tygodniach od podania alginianu. Obserwowano stopniową degradację implantu (→) oraz przerost nabłonka pęcherza moczowego. Nie stwierdzono cech reakcji zapalnej w obrębie ściany pęcherza (błękit alcjana, pow. 40 ×).

dowlane składające się z pożywki Ham's F-12 suplementowanej 10% surowicą wołową płodową (FBS, Fetal Bovine Serum, Sigma) z dodatkiem kwasu askorbinowego (Sigma), amfoterycyny B (Sigma) i antybiotyków. W sterylnych warunkach pobraną tkankę rozdrobniono mechanicznie na skrawki o wielkości do 0,5 mm. Rozdrobioną tkankę poddano trawieniu enzymatycznemu w kolagenazie II (1 mg/ml, Sigma) i hialuronidazie (0,5 mg/ml, Sigma). Trawienie przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Po 10 godzinach kąpeli enzymatycznej komórki odwirowano odrzucając nadsącz. Około  $10^6$  komórek zawieszonych w 1 ml pożywki przeniesiono do butelek hodowlanych o powierzchni wzrostu  $25 \text{ cm}^2$  (Corning) zawierających 4 ml medium do hodowli chondrocytów.

W celu odróżnicowania chondrocytów, komórki hodowano w jednej warstwie w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  i atmosferze  $5\% \text{ CO}_2$ . Pożywkę wymieniało się co 3 dni. Komórki pasażowano po uzyskaniu 70-90% pokrycia powierzchni dna butelki. Do pasaży używano trypsyny i EDTA (Sigma). Po 5 pasażach komórki zostały zamrożone i przez 3 miesiące przebywały w temperaturze  $-80^\circ\text{C}$ . Wykonano ocenę cytologiczną rozmazu komórek utrwalając je Cytofixem (Samko) i barwiąc błękitem alcjana w celu potwierdzenia obecności depozytów siarczanów glikozaminoglikanów (GAG). Badaniu poddano hodowlę z drugiego pasażu, jak i komórki po rozmrożeniu.

### **3.3. Hodowla komórek chrząstki na włóknach alginianu (Sorbalgone, Hartmann)**

Odróżnicowaną hodowlę chondrocytów ( $3 \times 10^6$  komórek/ml), wysiano na sieć włókien alginianu (Sorbalgone, Hartmann). Morfologię komórek rosnących na przestrzennym rusztowaniu zbudowanym z włókien alginianu obserwowano przyżyciowo pod mikroskopem kontrastowo-fazowym.

### **3.4. Ocena możliwości produkcji substancji międzykomórkowej przez uprzednio odróżnicowane chondrocyty rosnące na podłożu przestrzennym z alginianu**

Do doświadczenia wykorzystano chondrocyty po 3 pasażach od momentu rozmrożenia. Utworzono zawiesinę z komórek w 1% roztworze alginianu. Zawiesinę o gęstości  $3 \times 10^6$  komórek/ml przepuszczono przez igłę 23G i umieszczono w 102 mM roztworze  $\text{CaCl}_2$ . Otrzymane w ten sposób zestalone krople alginianu z komórkami hodowano zawieszono w uprzednio przygotowanej pożywce do hodowli chondrocytów przez 7 dni. Po tym okresie podłoże z alginianu rozpuszczono w buforze cytrynianowym (55 mmol/l cytrynian sodu i 0,15 mol/l NaCl). Otrzymane komórki poddano ocenie cytologicznej z użyciem barwienia błękitem alcjana.

Patolog oceniający preparaty nie posiadał informacji na temat sposobu hodowania dostarczanych komórek. Wykonano dokumentację fotograficzną.

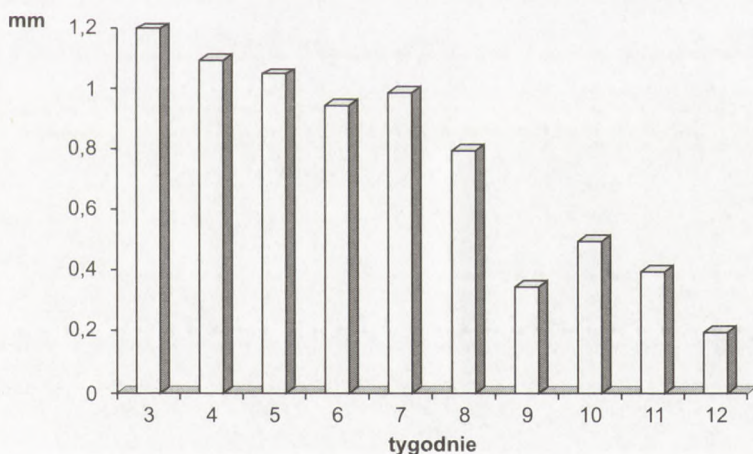
## 4. Wyniki

### 4.1. Degradacja alginianu w ścianie pęcherza moczowego szczura

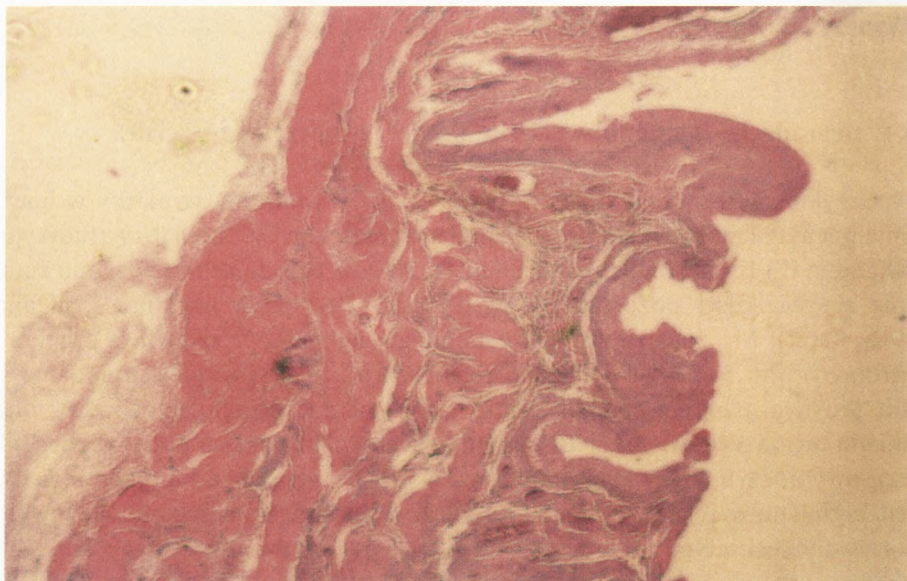
Wstrzyknięty zestalony alginian tworzył dobrze widoczne struktury w bocznej ścianie pęcherza moczowego (fot. 2). Implant z alginianu wybarwiał się tradycyjnym barwieniem H+E, jak i błękitem alcjanu (fot. 3). Po 8 tygodniach zauważono zmniejszanie się wielkości pozostawionego w ścianie pęcherza implantu z alginianu (fot. 4, rys. 1). Nie znaleziono nie zestalonego alginianu w żadnym z preparatów kontrolnych (fot. 5). Nie stwierdzono cech reakcji zapalnej w miejscu podania alginianu. Jedynym efektem ubocznym, który zanotowano po implantacji zestalonego alginianu był odczynowy przerost nabłonka pęcherza w miejscu podania (fot. 3). Był to czasowy odczyn, który ulegał zanikowi około 10 tygodnia od momentu wstrzyknięcia alginianu w ścianę pęcherza. Komórki w obrębie przerośniętej śluzówki nie wykazywały cech atypii.

### 4.2. Hodowla chondrocytów rosnących w pojedynczej warstwie

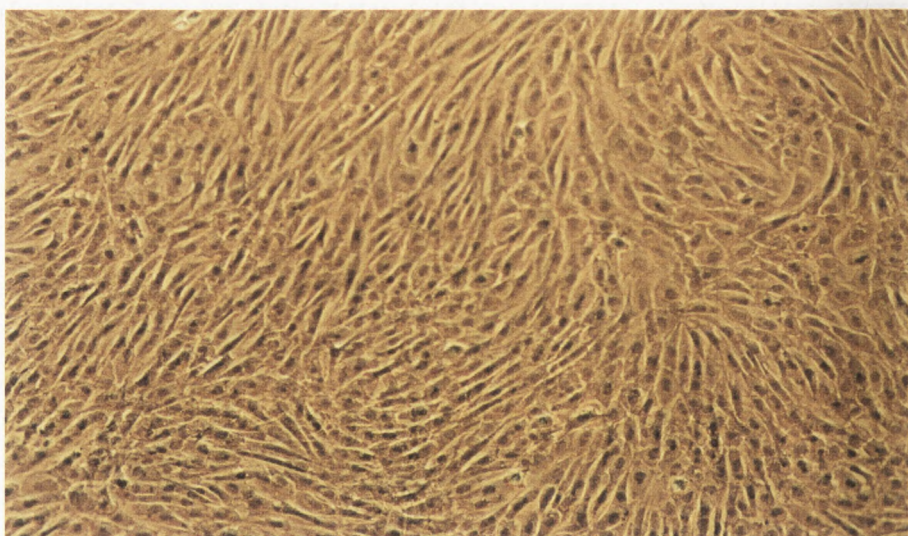
Komórki rosnące w warstwie przyklejały się do podłoża butelki hodowlanej. Intensywna proliferacja chondrocytów wymagała pasażowania co 5 dni. Chondrocyty posiadały wydłużony, wielokątny kształt. Hodowle scharakteryzowano jako fibroblastopodobne (fot. 6). W chondrocytach hodowli pierwotnej z ósmego pasażu rosnących w warstwie nie zaobserwowano produkcji substancji macierzy zewnątrz-



Rys. 1. Wyniki pomiarów szerokości w najgrubszym miejscu implantu z alginianu w ścianie pęcherza moczowego szczura. Pomiary wykonano w mikroskopie optycznym przy pow. 50 ×.

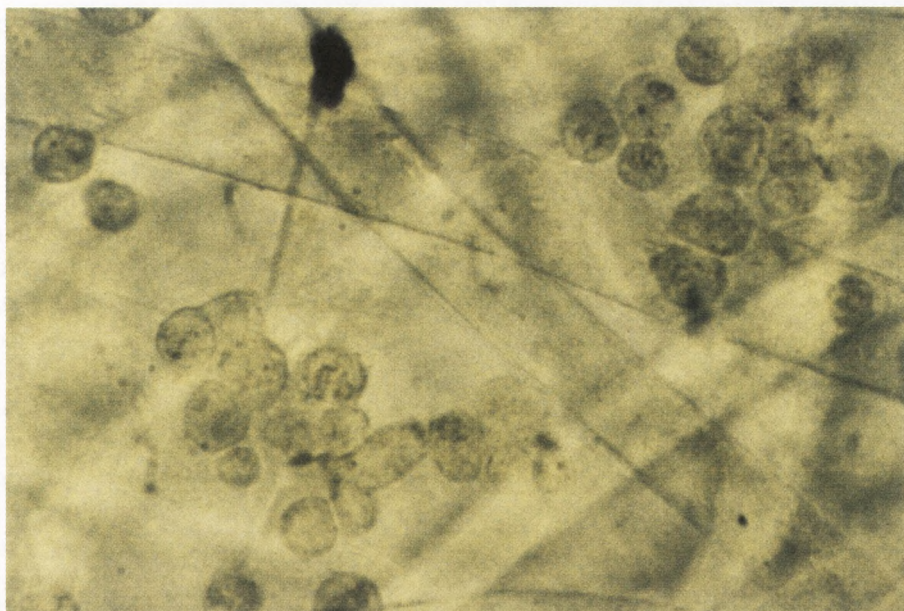


Fot. 5. Przekrój poprzeczny ściany pęcherza moczowego po 5 tygodniach od podania nie zestalonego alginianu – grupa kontrolna. Nie obserwowano obecności depozytów alginianu (błękit alcjanu, pow. 50 ×).

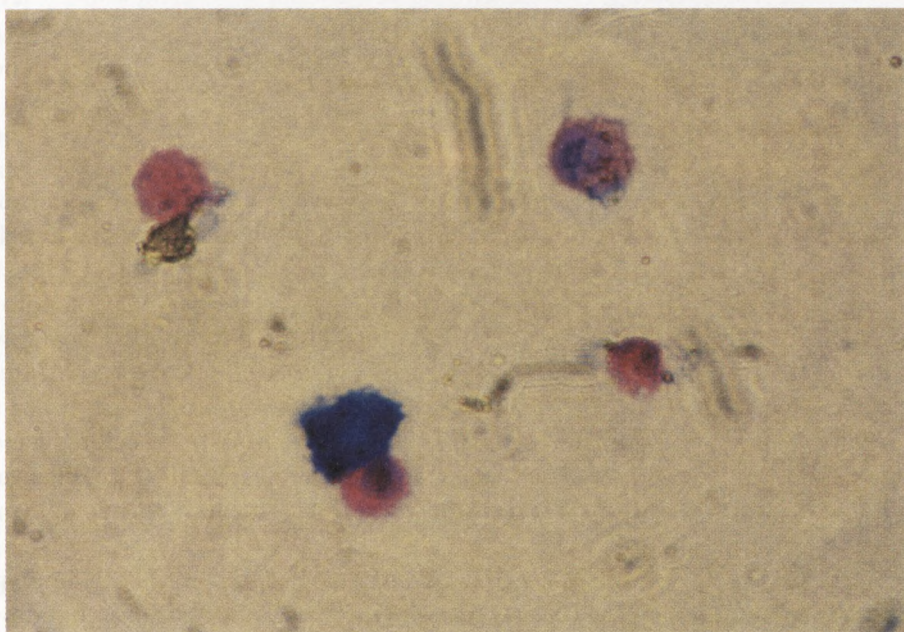


Fot. 6. Pierwotna hodowla chondrocytów szczura. Komórki fibroblastopodobne rosnące w pojedynczej warstwie (mikroskop kontrastowo-fazowy, pow. 100 ×).





Fot. 7. Hodowla chondrocytów w 5 dobie po posianiu na włókna alginianu (Sorbalgone, Hartmann). Widoczne zgrupowania chondrocytów między włóknami alginatu. Obserwacja przyżyciowa w mikroskopie kontrastowo-fazowym, pow. 100  $\times$ .



Fot. 8. Preparat cytologiczny wykonany z komórek rosnących w żelu alginianowym. Po 7 dobach widoczne są barwiące się na niebiesko GAG w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (błękit aljanu, pow. 100  $\times$ ).

zewnątrzkomórkowej, świadczą od odróżnicowaniu komórek w intensywnej hodowli jednowarstwowej.

#### **4.3. Hodowla komórek chrząstki na włóknach alginianu (Sorbalgone)**

Po 3 dobach od posiania odróżnicowanych chondrocytów na konstrukcję z włókien alginianu obserwowano przyżyciowo zgrupowania komórek między włóknami alginianu. Chondrocyty ściśle do siebie przylegały i charakteryzowały się kulistym kształtem (fot. 7). Obserwowano figury podziałów. Hodowlę prowadzono przez 10 dni.

#### **4.4. Ocena możliwości produkcji siarczanów glikozaminoglikanów (GAG) przez chondrocyty rosnące na podłożu przestrzennym z alginianu**

Odróżnicowane chondrocyty hodowane w żelu alginianowym wykazywały już po 7 dniach hodowli przestrzennej zdolność do syntezy siarczanów glikozaminoglikanów. Komórki przybierały kształt kulisty. Na zewnętrznej powierzchni komórek widoczne były barwiące się na niebieski kolor depozyty GAG wybarwione błękitem alcjana (fot. 8). Obecność depozytów substancji zewnątrzkomórkowej oraz zdolność do wzrostu na rusztowaniu przestrzennym są pośrednimi dowodami świadczącymi o reekspresji cech fenotypowych.

### **5. Dyskusja**

Komórki chrzęstne rosnące w warstwie, w pożywce z dodatkiem surowicy, ulegają odróżnicowaniu, tracą fenotyp i zdolność do produkcji substancji zewnątrzkomórkowej niezbędnej dla utrzymania właściwości fizycznych chrząstki (19). Do czynników odpowiedzialnych za odróżnicowanie rosnących w warstwie chondrocytów należą PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*, type BB), TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor* beta 1), oraz FGF2 (*Fibroblast Growth Factor* 2) (20). Komórki takie charakteryzują się morfologią podobną do fibroblastów. Przyspieszona proliferacja wiąże się z obniżeniem produkcji charakterystycznych dla tkanki chrzęstnej proteoglikanów substancji zewnątrzkomórkowej, agrekanu oraz kolagenu typu II. Odróżnicowane komórki chrzęstne cechują się również podwyższoną ekspresją kolagenu typu I i wersykanu (21).

Alginian jest podłożem stosowanym w celu uzyskania reekspresji cech fenotypowych uprzednio odróżnicowanych w wyniku intensywnego namnażania chondrocytów (22,23). Komórki hodowane na podłożu z alginianu wykazują reekspresję cech fenotypowych po 3 tygodniach, a proces pełnego zróżnicowania komórek w hodow-

li wymaga kilku kolejnych tygodni (24,25). Gagne i wsp. (26) zaobserwowali w przekrojach hodowli chondrocytów w alginianie po 12 tygodniach obecność cienkich włókien kolagenowych przenikających wyprodukowaną przez komórki macierz zewnątrzkomórkową. Binette i wsp. (21) obserwowali cechy fenotypowe chondrocytów nawet po 5 miesiącach prowadzenia hodowli w żelu alginianowym. Alginian w ścianie pęcherza moczowego szczura był dobrze widoczny jeszcze po 10 tygodniach od implantacji. Uważamy, że jest to okres wystarczający chondrocytom na osiągnięcie reekspresji cech fenotypowych i umożliwiającą im wyprodukowanie dostatecznej ilości własnej macierzy zewnątrzkomórkowej, która będzie substancją podporową, niezbędną w przypadku leczenia refluku pęcherzowo-moczowodowego. Jednocześnie poza czasowym odczynem hipertroficznym ze strony nabłonka pęcherza moczowego nie obserwowano żadnych niepożądanych skutków ubocznych po podaniu zestalonego alginianu. Nie stwierdzono cech reakcji zapalnej w obrębie warstwy mięśniowej pęcherza moczowego ani odczynu ze strony jamy otrzewnej.

Doświadczenie z użyciem włókien alginianu (Sorbalgone) pozwoliło obserwować przyżyciowo proliferujące chondrocyty o kształtach odmiennych od komórek rosnących w pojedynczej warstwie. Zmiana kształtu komórek kulistych jest dowodem pośrednio świadczącym o przydatności tego podłoża do uzyskania reekspresji fenotypu hodowanych chondrocytów (27).

W ostatnim etapie doświadczenia zaobserwowano inicjację procesu produkcji macierzy zewnątrzkomórkowej przez chondrocyty rosnące w żelu alginianowym *in vitro*. Komórki w preparatach cytologicznych otrzymane z hodowli przestrzennej wykazywały podobny wygląd do komórek rosnących na włóknach alginianu (Sorbalgone). Barwienie błękitem alcjanu wykazało obecność niebieskich depozytów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co potwierdza fenotyp chrzęstny hodowanych komórek (fot. 8). Podłoże przestrzenne z alginianu, jak się wydaje, jest biomateriałem umożliwiającym chondrocytom odpowiednie warunki do produkcji substancji zewnątrzkomórkowej. Synteza substancji zewnątrzkomórkowej pozwala komórkom tworzyć tkankę o właściwościach fizycznych, zbliżonych do natywnej chrząstki.

## 6. Wnioski

Alginian jest podłożem, które pozwala na otrzymanie trwałych implantów stanowiących konstrukcję przestrzenną dla chondrocytów. Okres degradacji alginianu stwarza chondrocytom możliwość różnicowania i podziałów. Efektem ubocznym stosowania alginianu jest czasowy przerost nabłonka pęcherza moczowego. Wzrost chondrocytów na rusztowaniu z alginianu sugeruje reekspresję ich cech fenotypowych, potwierdzonych morfologią komórek oraz obecnością substancji macierzy zewnątrzkomórkowej.

**Literatura**

1. Atala A., (1998), *Urol. Clin. North Am.*, 25, 39-50.
2. Caldamone A. A., Diamond D. A., (2001), *J. Urol.*, 165, 2224-2227.
3. Risbud M., Ringe J., Bhone R., Sittinger M., (2001), *Cell Transplant*, 10(8), 755-763.
4. Puelacher W., C., Mooney D., Langer R., Upton J., Vacanti J., P., Vacanti C., A., (1994), *Biomaterials*, 10(15), 774-778.
5. Lavezzi A., Mantovani M., della Berta L., G., Maturri L., (2002), *J. Otolaryngol.*, 31(6), 366-370.
6. Rotter N., Aigner J., Naumann A., Planck H., Hammer C., Burmester G., Sittinger M., (1998), *J. Biomed. Mater. Res.*, 42(3), 347-356.
7. Lee C. J., Moon K. D., Choi H., Woo J. I., Min B., H., Lee K. B., (2002), *J. Cardiovasc. Surg.*, 43, 275-279.
8. Peretti G. M., Caruso E. M., Randolph M. A., Zaleske D. J., (2001), *J. Orthop. Res.*, 19, 278-285.
9. Peterson L., Minas T., Brittberg M., Nilsson A., Sjogren-Jansson E., Lindahl A., (2000), *Clin. Orthop.*, 374, 212-234.
10. Löhnert J., Ruhnau K., Gossen A., Bernsmann K., Wiese M., (1999), *Arthroskopie*, 12, 34-42.
11. Diamond D. C., Caldamone A. A., (1999), *J. Urol.*, 162, 1185-1188.
12. Kumon H., Tsugawa M., Ozawa H., Monden K., Ohmori H., (1997), *Int. J. Urol.*, 4(6), 541-545.
13. Kato T., Nakada T., Ishigooka M., Hashimoto T., Sasagawa I., Kubota Y., Suzuki H., (1995), *Int. Urol. Nephrol.*, 27(6), 709-715.
14. Oswald J., Riccabona M., Lusuardi L., Bartsch G., Radmayr C., (2002), *Urology*, 60(5), 894-897; discussion 898.
15. Haferkamp A., Contractor H., Mohring K., Staehler G., Dorsam J., (2000), *Urology*, 55(5), 759-763.
16. Malizia A. A., Jr, Reiman H. M., Myers R. P., Sande J. R., Barham S. S., Benson R. C., Jr, Dewanjee M. K., Utz W. J., (1984), *JAMA*, 251(24), 3277-3281.
17. Malizia A. A. Jr, Dewanjee M. K., Reiman H. M., Barham S. S., Myers R. P., Hammell T. C., Sarde J. R., Benson R. C., Jr, Utz W. J., (1984), *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 30, 330-334.
18. Lee D. A., Reisler T., Bader D. L., (2003), *Acta Orthop. Scand.*, 74(1), 6-15.
19. Shakibaei M., de Souza P., Merker H. J., (1997), *Cell Biol. Int.*, 21(2), 115-125.
20. Barbero A., Ploegert S., Heberer M., Martin I., (2003), *Arthritis Rheum*, 48(5), 1315-1325.
21. Binette F., McQuaid D. P., Haudenschild D. R., Yaeger P. C., McPherson J. M., Tubo R. (1993), *J. Orthop. Res.*, 16(2), 207-216.
22. Bonaventure J., Kadhon N., Cohen-Solal L., Ng K., H., Bourguignon J., Lasselin C., Freisinger P., (1994), *Exp. Cell Res.*, 212(1), 97-104.
23. Lemare F., Steimberg N., Le Griel C., Demignot S., Adolphe M., (1998), *J. Cell Physiol.*, 176(2), 303-313.
24. van Osch G. J., van der Veen S. W., Verwoerd-Verhoef H. L., (2001), *Plast Reconstr. Surg.*, 107(2), 433-440.
25. Perka C., Spitzer R. S., Lindenhayn K., Sittinger M., Schultz O., (2000), *J. Biomed Mater. Res.*, 49(3), 305-311.
26. Gagne T. A., Chappell-Afonso K., Johnson J. L., McPherson J. M., Oldham C. A., Tubo R. A., Vaccaro C., Vasio G. W., (2000), *J. Orthop. Res.*, 18(6), 882-890.
27. Glowacki J., Trepman E., Folkman J., (1983), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 172(1), 93-98.