



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX—XXXX

组织工程医疗产品 用以评价软骨形成的硫酸糖胺聚糖 (sGAG) 的定量检测

Tissue-engineered medical products — Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis

(ISO 13019:2018 Tissue-engineered medical products — Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis, MOD)

(征求意见稿)

(本稿完成日期: 2020-7-6)

在提交反馈意见时, 请将你所知道的相关专利连同支持性文件一并附上, 并对“建议本标准自发布之日起 12 个月实施”反馈意见。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局

发布

目 次

前言	2
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 概述和原理	4
5 仪器和材料	5
6 测试样品中平行测试样品的准备	5
7 实验步骤	5
8 检测报告	7
9 评价	8
附录 A (资料性附录) 试剂	9
附录 B (资料性附录) sGAG 含量检测报告模板	10
附录 C (资料性附录) 实验流程图	12
附录 D (资料性附录) 供选择的预处理方法	13
附录 E (资料性附录) 供选择的 sGAG 提取方法	14
参考文献	16

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准使用重新起草法修改采用国际标准ISO 13019:2018 组织工程医疗产品 用于评价软骨形成的硫酸糖胺聚糖 (sGAG) 的定量检测 (Tissue-engineered medical products — Quantification of sulfated glycosaminoglycans (sGAG) for evaluation of chondrogenesis)。

本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准的归口单位为全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会 (SAC/TC110/SC3) 归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院，四川大学（四川医疗器械生物材料和制品检验中心）。

本标准主要起草人：

组织工程医疗产品 用以评价软骨形成的硫酸糖胺聚糖（sGAG）的定量检测

1 范围

本标准给出了硫酸糖胺聚糖（sGAG）的定量检测方法。本标准适用于关节软骨、半月板、弹性软骨、组织工程软骨等的细胞外基质中硫酸糖胺聚糖含量检测。

注：本标准中给出的方法也适用于对含有sGAG的外科修复材料进行含量检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 36988 组织工程用来源组织操作规范指南

ISO 13022-2012 含人源活细胞医疗产品——风险管理应用和工艺要求（Medical products containing viable human cells—Application of risk managements and requirements for processing practices）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

组织工程软骨 tissue engineered cartilage

通过将软骨细胞或干细胞等活细胞与支架或其它类型的生物材料结合，或不与材料结合，而获得的软骨构建物。

3.2

硫酸糖胺聚糖 sulfated glycosaminoglycans

以重复二糖为单元的硫酸化位置可变的无支链长链聚合物。

示例：硫酸软骨素、硫酸角质素、硫酸皮质素。

3.3

测试样品 test sample

一份组织工程软骨（3.1）

3.4

平行测试样品 parallel test sample

从测试样品（3.3）中分出的三份样品之一。

注：该方法给出每个平行测试样品sGAG检测值。

3.5

半胱氨酸 cysteine

一种非必需含硫氨基酸，用于消化溶液的制备。

3.6

木瓜蛋白酶 papain

半胱氨酸蛋白酶，用于消化不同组织的细胞外基质。

[来源：酶学委员会（EC）编号3.4.22.2]

3.7

1,9-二甲基亚甲基蓝 1,9-dimethylmethelene blue

一种能与多种硫酸糖胺聚糖（3.2）特异性结合的染料，其吸光度与所结合sGAG的含量呈线性关系。

3.8

6-硫酸软骨素 chondroitin 6-sulfate

一种硫酸化的糖胺聚糖（sGAG），是软骨和结缔组织的重要组成成分。

4 概述和原理

由于硫酸糖胺聚糖（sGAG）是天然软骨的细胞外基质主要成分之一，因此在评价组织工程构建物的软骨形成时sGAG含量是首选的检测指标。

使用酶消化测试样品，将sGAG提取到消化液中，并与能和sGAG结合的染料孵育后测定吸光度，根据标准曲线换算成消化液中sGAG浓度，然后用测试样品的质量（湿重或干重）或DNA含量进行归一化计算，可测定单位质量或DNA含量样品中的sGAG含量。

本标准中的方法可用于检测组织工程软骨构建物的sGAG含量，可提供标准曲线3 μg/mL~100 μg/mL的动态测量范围。

本标准选用了广泛应用于sGAG定量检测的1,9-二甲基亚甲基蓝（DMMB）染料，用于sGAG定量检测。sGAG定量检测包括以下步骤：

- a) 预处理；
- b) sGAG的提取；
- c) DMMB实验测定sGAG含量；
- d) sGAG含量的归一化计算。

为了实现准确的定量，应注意如质量和体积的称量取样、移液管的操作和标准曲线的绘制等关键步骤。

在检测过程中，除另有说明外，仅使用公认的分析级蒸馏水或同等纯度水（见附录A）。

附录B对sGAG测量的报告格式进行了举例说明。

5 仪器和材料

- a) 洁净工作台;
- b) 灭菌器 例如高压灭菌锅;
- c) 倒置显微镜;
- d) 细胞培养箱, 5 %浓度二氧化碳, 温度37 °C, 具有一定湿度的培养环境;
- e) 细胞计数装置, 例如血细胞计数器;
注: 如适用, 可参考ISO 20391-1: 2018。
- f) 离心机;
- g) 天平;
- h) 加热装置, 能够维持60°C, 最好是恒温箱, 试管中液体能均匀受热;
- i) 分光光度计或者酶标仪;
- j) 无菌刀片;
- k) 无菌离心管;
- l) 无菌组织培养皿。

6 测试样品中平行测试样品的准备

6.1 概述

组织工程软骨及其平行测试样品应假定具有潜在传染性, 如果涉及人源细胞, 按照GB/T 36988和ISO 13022采取相应的预防措施, 其中ISO 13022 中“含有人体活细胞的医疗产品”可被解读为本标准中的“组织工程软骨”。

6.2 平行测试样品的制备

组织工程软骨和平行测试样品应谨慎操作, 用于切割组织工程软骨的工具应无菌, 避免污染。

a) 配制含有5 mM 半胱氨酸-盐酸 (cysteine-HCl) 和5 mM 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 的磷酸盐缓冲液 (PBS): 氯化钠 (NaCl) 8.00 g/L、氯化钾 (KCl) 0.20 g/L、磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 1.44 g/L、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.24 g/L, pH 7.4, 用盐酸 (HCl) 调整pH值为6.0, 用0.2 μm 滤膜过滤除菌, 并于4 °C储存;

b) 在生物安全柜里, 从组织工程软骨切一个完整的厚片作为测试样品;

c) 将测试样品分为3个形态相同的部分, 测量他们的湿重, 将平行测试样品转移到PBS溶液中。

注1: 平行测试样品最小 sGAG 含量检测限是 0.3 μg (比色皿法) 或 0.06 μg (微孔板法)。

注2: 称量样品时确保没有液体。

7 实验步骤

7.1 概述

组织工程软骨中的硫酸糖胺聚糖通过以下四个步骤进行定量检测: 预处理、sGAG的提取、sGAG含量的测定以及sGAG含量的归一化计算。整个实验的流程图见附录C。

7.2 平行测试样品预处理

- a) 从PBS溶液中取出每个平行测试样品;

b) 使用适当的刀片，将平行测试样品切碎（约1 mm），利于后续的消化提取；

注：可供选择的其它方法（粉碎或冻干）见附录D。

c) 将切碎的平行测试样品放入离心管中，离心后弃去液体；

d) 用装有平行测试样品的离心管质量减去空离心管质量计算每个平行测试样品的质量，为保证称量准确宜防止平行测试样品干燥；

e) 进行下一步的提取。

7.3 从预处理的平行测试样品中提取 sGAG

7.3.1 概述

应将平行测试样品分别进行消化以提取sGAG。由于木瓜蛋白酶是对不同软骨基质消化比较充分的方法，推荐使用此法进行消化。若含有支架，可根据支架类型选用其它适用方法（如：胶原酶消化、胍盐提取、胍提取/胃蛋白酶消化/弹性蛋白酶消化；见附录E）。

当支架由胶原凝胶组成时可以采用胶原酶消化。当酶解法不适用时，可以采用胍盐提取法，当酶解法和胍盐提取法均不适用时，可使用胍提取/胃蛋白酶消化/弹性蛋白酶消化。

7.3.2 木瓜蛋白酶消化

a) 配制提取试剂：用PBS配制木瓜蛋白酶（冻干粉，比活性值 >10 U/mg蛋白）溶液，浓度为 $125 \mu\text{g/mL}$ ，现用现配；

b) 将加热装置预热至 60°C ，备用；

c) 在装有样品的离心管中加入9倍样品体积的木瓜蛋白酶溶液消化预处理的平行测试样品，于 60°C 加热装置内持续消化6小时或过夜；

注1：以平行测试样品密度为 1 g/mL 计算每个测试样品体积。

注2：使用合适的仪器，例如振动器（ $20 \text{ rpm} \sim 60 \text{ rpm}$ ）或者旋转器（ $2 \text{ rpm} \sim 10 \text{ rpm}$ ）使平行测试样品完全浸入消化液。

d) 消化结束后，将平行测试样品 $5\ 000 \text{ g}$ 离心 3 min ，将每个样品上清液分别转移到新的离心管中。

7.4 DMMB 实验测定样品 sGAG 含量

7.4.1 原理

sGAG含量是通过DMMB来测定的。DMMB染料可与sGAG结合，是定量测定sGAG最常用的试剂。用6-硫酸软骨素的标准曲线确定sGAG浓度。被消化的平行测试样品也可用来测量总DNA含量，作为样品中sGAG含量归一化时湿重的替代方法。

sGAG含量测定的方法包括以下两个步骤：DMMB试剂的配制和实验。

7.4.2 DMMB 试剂的配制

a) 在烧杯中加入 16 mg DMMB和 5 mL 乙醇并搅拌，用锡箔纸包裹避光；

b) 加 3.04 g 甘氨酸（glycine）， 2.37 g NaCl 和 95 mL 0.1 N HCl；

c) 加入 800 mL 的蒸馏水，并用 0.1 N HCl调节PH至 3.0 ；

d) 加蒸馏水定容至 $1\ 000 \text{ mL}$ ；

e) 在室温下用磁力搅拌器搅 $2 \text{ h} \sim 16 \text{ h}$ ，避光。

f) 用适当的滤纸过滤试剂（例如用 $20 \mu\text{m} \sim 25 \mu\text{m}$ 的滤纸除去杂质）；

g) 将试剂放入棕色瓶中室温保存，每三个月重新配置试剂。

7.4.3 DMMB 实验

a) 将10.0 mg 6-硫酸软骨素（纯度>95%）加入20 mL提取液中，制备0.5 mg/mL的6-硫酸软骨素溶液，搅拌数分钟使其完全溶解；

宜根据7.3中sGAG提取液选择相应的溶剂。当选择木瓜蛋白酶法消化时应选择木瓜蛋白酶溶液。

注：制作标准曲线的溶剂应尽可能与试验样品提取溶剂相似，这将有助于避免对测试样品提取液中DMMB-sGAG结合的潜在干扰，从而使定量更精确。

b) 用提取液配制一系列浓度的6-硫酸软骨素溶液，分别为0 μg/mL、3.125 μg/mL、6.25 μg/mL、12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL；

c) 开启分光光度计或者酶标仪；

d) 将0.1 mL的提取样品或者标准品加入1 mL的DMMB溶液中，混匀，用比色皿法测量，或者将0.02 mL的提取样品或者6-硫酸软骨素标准品加入0.2 mL DMMB溶液中，混匀，用微孔板法测量；

注：如适用，宜将样品进行适当稀释，保证样品中的sGAG浓度在标准曲线的线性范围内。

e) 用分光光度计（比色皿法）或酶标仪（微孔板法）立即测量（混合后3分钟内）530 nm的吸光度（525 nm~535 nm）。时间超过3分钟可能导致凝结，影响测量的准确性。

试验需要三个重复（即3个平行测试样品）来计算标准差，以便了解单个测试样品在整个测量过程中的差异。

注：需要确认来源于支架提取液的其他产物不会干扰试验。在某些条件下，透明质酸或未硫酸化糖胺聚糖即使没有硫酸基团也可以和DMMB形成复合物，如果需要对sGAG含量进行精确测量的情况下，应参考文献改良方案（Chandrasekhar S, et al., 1987）。

7.5 sGAG 含量的归一化

归一化后sGAG含量的测量精度主要取决于标准曲线的可靠性。线性回归分析可用于评价标准曲线。依据平行测试样品中的sGAG含量的估计值（或预实验）确定测试样品的合适稀释倍数。

a) 将吸光度转换成sGAG浓度（μg/mL）。如上所述，要注意待测样品的光吸收值应在标准曲线的线性范围之内，或者稀释样品至线性范围内。然后，乘以每个样品添加消化液体积和稀释倍数，得到样品中sGAG含量（μg）；

b) 将sGAG含量（μg）除以平行测试样品的湿重使其均一化为单位质量sGAG含量（μg/mg）。

$$\text{sGAG (}\mu\text{g/mg)} = A \times B \times C / D$$

式中，

A——sGAG浓度，μg/mL；

B——稀释倍数；

C——测试样品体积（提取液的体积+平行样品的体积），mL；

D——平行测试样品的湿重，mg。

注：既可以用样品的湿重对sGAG的含量进行归一化，也可以用样品的DNA含量进行归一化。

8 检测报告

检测报告应包含以下项目以便对结果进行独立评估。结果应以3个平行测试样品的归一化后sGAG含量的均值和标准差的形式表示。附录B举例说明了sGAG含量的检测报告格式，包括如下：

a) 测试样品描述

对测试样品的细胞来源、细胞接种密度、支架类型、开始培养日期和培养时间等方面的信息进行描述。

b) 测试样品预处理

对平行测试样品的预处理方式（切割、粉碎或冻干）和湿重测量方式进行描述。

c) 从预处理的平行测试样品中提取sGAG

对选择的提取sGAG的方法（如：木瓜蛋白酶/胶原酶消化、胍盐提取，或胍提取/胃蛋白酶消化/弹性蛋白酶消化）和所需添加溶液体积进行描述。

d) DMMB实验

对DMMB实验的测量方法（比色皿法或微孔板法），和标准曲线的相关系数（ r 值）进行描述。

e) sGAG含量的归一化

对公式（7.5）中的每个变量（ A 、 B 、 C 、 D ）的测量值进行描述。

9 评价

测量值可用于评价组织工程软骨形成或再生的软骨，同时应考虑到评价的阈值是根据样品的不同而可变的。一般情况下，样品中sGAG含量越高说明组织工程软骨或再生的软骨组织其成熟性越好，越接近生理性透明软骨。

附录 A
(资料性附录)
试剂

建议使用符合国家或国际处方 (NF) (中国药典、美国药典或欧洲药典) 的试剂。

- a) 蒸馏水, 如 ISO 3696 或 ASTM D1193-6 所述 1 型水或中国药典中规定的水;
- b) 磷酸盐缓冲液 (PBS), 不含钙和镁;
- c) 盐酸半胱氨酸 ($C_3H_5ClNO_2S$);
- d) 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物 (EDTA-2Na, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$);
- e) 盐酸 (HCl);
- f) 氢氧化钠 (NaOH);
- g) 木瓜蛋白酶;
- h) 二甲基亚甲基蓝 (DMMB, $C_{18}H_{22}C_1N_3S$);
- i) 乙醇 (C_2H_6O);
- j) 甘氨酸 ($C_2H_5NO_2$);
- k) 氯化钠 (NaCl);
- l) 消毒剂, 如 70% 乙醇;
- m) 6-硫酸软骨素。

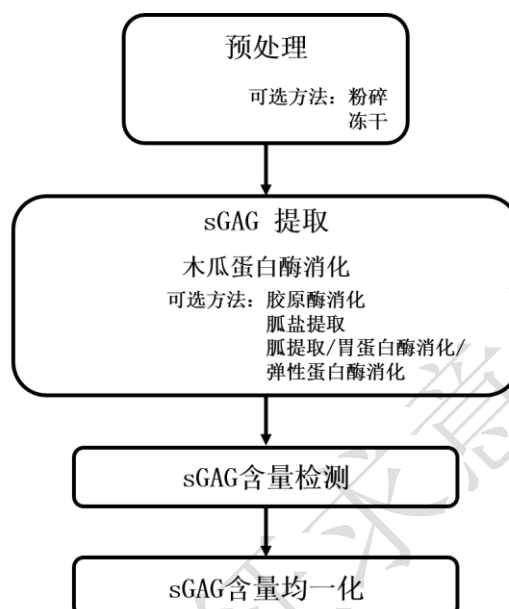
附 录 B
(资料性附录)
sGAG 含量检测报告模板

检测报告		
sGAG (μg/mg)	平行测试样品 1 平行测试样品 2 平行测试样品 3 平均值±标准差	
1) 检测样品的特性		
细胞来源 细胞接种密度 支架 开始培养日期 培养时间 其它观察		
2) 样品的预处理		
方法选择	<input type="checkbox"/> 切割 <input type="checkbox"/> (可选) 粉碎 <input type="checkbox"/> (可选) 冻干	
湿重 (mg)	平行测试样品 1 平行测试样品 2 平行测试样品 3	
其它观察		
3) 从预处理样品中提取 sGAG		
方法选择	<input type="checkbox"/> 木瓜蛋白酶消化 <input type="checkbox"/> (可选) 胶原酶消化 <input type="checkbox"/> (可选) 胍盐提取 <input type="checkbox"/> (可选) 胍提取/胃蛋白酶消化/弹性蛋白酶消化	
需添加溶液体积	平行测试样品 1 平行测试样品 2 平行测试样品 3	
其它		
4) DMMB 实验		
检测方法	<input type="checkbox"/> 分光光度计 (比色皿分析/法) <input type="checkbox"/> 酶标仪 (微孔板法分析)	
用于制定标准曲线的试剂	<input type="checkbox"/> 6-硫酸软骨素	

	<input type="checkbox"/> 其它 ()					
标准曲线相关系数 R 值	平行测试样品 1 平行测试样品 2 平行测试样品 3					
其它观察						
5) sGAG 含量的均一化						
sGAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $=A^*(\mu\text{g}/\text{mL}) \times B \times C(\text{mL}) / D(\text{mg})$		sGAG	A	B	C	D
	平行测试样品 1					
	平行测试样品 2					
	平行测试样品 3					
其它观察						

* DMMB试验中测量的原始数据应单独记录。

附录 C
(资料性附录)
实验流程图



标准草案

附 录 D
(资料性附录)
供选择的预处理方法

D.1 粉碎

粉碎是将平行测试样品研磨成粉末的预处理方法。

- a) 从PBS溶液中取出每个平行测试样品；
- b) 将平行测试样品分成小块，使其尺寸小于1 mm；
- c) 将分离的平行测试样品放入试管中进行粉碎；
- d) 计算每个平行测试样品的湿重，用含平行测试样品的试管质量减去空试管质量。防止平行测试样品变干以便准确称重；
- e) 冻结后立即用研钵或磨刀砂轮将液氮中的平行测试样品磨碎，并将其储存至-80℃，直到提取样品。

D.2 冻干

冻干是将平行测试样品冻干的预处理方法。

- a) 从PBS溶液中取出每个平行测试样品；
- b) 将平行测试样品切割成小块；
- c) 将平行测试样品放入试管中进行冻干；
- d) 计算每个平行测试样品的质量，用含平行测试样品的试管质量减去空试管质量，防止平行测试样品变干以便准确称重；
- e) 将平行测试样品进行冷冻干燥；
- f) 将冻干的平行测试样品放入试管中，加入1 mL-2 mL冷的蒸馏水。
- g) 4℃过夜后转移至-80℃储存直至提取。

附 录 E
(资料性附录)
供选择的 sGAG 提取方法

E.1 胶原酶消化

当支架是由胶原凝胶构成且加热装置不能维持60℃时建议使用胶原酶消化。

- a) 制备胶原酶溶液(基本成分培养基例如DMEM,含有2.5 mg/mL胶原酶(I型,干重时比活性> 125U/mg), 3 mM的氯化钙(CaCl₂)和0.25 %胰蛋白酶);
- b) 在消化前使用加热装置,使试剂的温度迅速达到37 ℃;
- c) 将适当体积的胶原酶溶液加入预处理的样品,并在37 ℃过夜孵育(平行测试样品的密度是1.0 g/mL)。可用振荡器或旋转器等使样品充分浸入溶液;
需要确定好消化液与平行测试样品的体积比,使sGAG浓度在标准曲线范围内;
- d) 样品在5 000 *g*离心3 min,并将上清液转移到合适的收集管。

E.2 胍盐提取法

胍盐提取法建议在木瓜蛋白酶消化和胶原酶消化不可用的情况下使用。

- a) 准备100 mL盐酸胍(GuCl)提取缓冲液(4 M GuCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA),根据下列步骤:添加38.2 g盐酸胍到80 mL蒸馏水中,加入5 mL的pH值7.5的1M Tris-HCl,再加入200 μL的500 mM EDTA。搅拌至完全溶解,然后加蒸馏水至100 mL;
- b) 提取前准备好制冷装置,使试剂温度迅速变为4℃;
- c) 将预处理的平行测试样品与适当体积GuCl提取缓冲液混合,4 ℃过夜提取(平行测试样品的密度是1.0 g/mL),可用振荡器或旋转器等使样品充分浸入溶液。需要确定好消化液与平行测试样品的体积比,使sGAG浓度在标准曲线范围内;
- d) 样品在5 000 *g*离心3 min,并将上清液转移到合适的收集管。

E.3 胍提取/胃蛋白酶消化/弹性蛋白酶消化

E.3.1 试剂体积的调整

建议试剂体积适用于5 mg~10 mg(湿重)样品,并需根据不同样品调整,在称量样品时应保持无液体。

E.3.2 胍提取

- a) 制备胍提取液(3 M胍溶于0.05 M Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5);
- b) 提取前准备好制冷装置,使试剂温度迅速变为4℃;
- c) 准备收集管(如50 mL的离心管);
- d) 用5 mL胍提取液重悬平行测试样品,并置于旋转器上混合,4℃过夜。用台式离心机在5 000 *g*离心3 min,收集上清液至步骤E.3.2-c的离心管中;

e) 用5 mL冷蒸馏水清洗沉淀去除胍, 用台式离心机在5 000 *g*离心3 min。收集上清液, 并与3 M胍提取液(来自步骤E. 3. 2-d)混合;

f) 用5 mL的0.05 M醋酸重悬沉淀, 并于4 °C过夜孵育去除胍。用台式离心机在5 000 *g*离心3 min。收集上清液并与3 M胍提取液(来自步骤E. 3. 2-d)混合。

E. 3. 3 胃蛋白酶消化

选择胃蛋白酶消化法应在胍提取法之后。

a) 准备0.1 mg/mL胃蛋白酶(冻干粉, 比活性>2500 U/mg)消化液, 溶于0.05 M的醋酸;

b) 提取前准备好制冷装置, 使试剂温度迅速变为4°C;

c) 每个样品加5 mL胃蛋白酶消化液, 置于旋转器上轻微振摇, 于4 °C孵育24 h~48 h。不定时的用力搅拌以分散组织;

d) 将处理后样品在5 000 *g*离心3 min, 收集上清液转移到步骤E. 3. 2-d的收集管中, 然后在收集管中加入0.5 mL的1M tris-1.5 M NaCl缓冲液(10×TBS, pH 7.5);

e) 重复步骤E. 3. 3-c-d多次(约3次), 直到所有平行测试样品溶解。

E. 3. 4 弹性蛋白酶消化

选择弹性蛋白酶消化应在胃蛋白酶消化后。

a) 准备0.1 mg/mL弹性蛋白酶(干粉, 比活性 \geq 4 U/mg, 来源猪胰腺)溶液, 溶解在0.1 M的tris-0.15 M NaCl-5 mM CaCl₂(pH 7.8);

b) 提取前准备好制冷装置, 使试剂温度迅速变为4°C;

c) 每个样品加5mL弹性蛋白酶溶液, 置于旋转器上于4°C孵育24 h;

d) 在5 000 *g*离心3 min, 并将上清液转移到合适的收集管。

如果在消化酶消化后仍有沉淀, 可视为不溶性物质。

参 考 文 献

- [1] ISO 9000, Quality management systems — Fundamentals and vocabulary
- [2] ISO 10993-1, Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process
- [3] ISO/TS 10993-19, Biological evaluation of medical devices — Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials
- [4] ISO 12891-1, Retrieval and analysis of surgical implants — Part 1: Retrieval and handling
- [5] ISO 14155-1, Clinical investigation of medical devices for human subjects — Part 1: General requirements
- [6] ISO 14155-2, Clinical investigation of medical devices for human subjects — Part 2: Clinical investigation plans
- [7] ISO 14971, Medical devices — Application of risk management to medical devices
- [8] ISO 20391-1, Biotechnology — Cell counting — Part 1: General guidance on cell counting methods
- [9] ASTM F2027-00, Standard guide for characterization and testing of substrate materials for tissue- engineered medical products
- [10] ASTM F2150-07, Standard guide for characterization and testing of biomaterial scaffolds used in tissue-engineered medical products
- [11] ASTM F2210-02, Standard guide for processing cells, tissues, and organs for use in tissue engineered medical products
- [12] ASTM F2212-02, Standard Guide for Characterization of Type I Collagen as Starting Material for Surgical Implants and Substrates for Tissue Engineered Medical Products (TEMPs)
- [13] ASTM F2312-04, Standard Terminology Relating to Tissue Engineered Medical Products
- [14] ASTM F2315-03, Standard Guide for Immobilization or Encapsulation of Living Cells or Tissue in Alginate Gels
- [15] ASTM F2383-05, Standard guide for assessment of adventitious agents in tissue engineered medical products (TEMPs)
- [16] ASTM F2451-05, Standard guide for in vivo assessment of implantable devices intended to repair or regenerate articular cartilage
- [17] Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, 2001
- [18] Chandrasekhar S., Esterman M.A., Hoffman H.A. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal. Biochem.* 1987, 161 pp. 103-108
- [19] Dey P., Saphos C.A., McDonnell J., Moor V.L. Studies on the quantification of proteoglycans by the dimethylmethylene blue dye-binding method, Specificity, quantitation in synovial lavage fluid, and automation. *Connect. Tissue Res.* 1992, 28 pp. 317-324

- [20] Farndale R.W., Buttle D.J., Barrett A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986, 883 pp. 173–177
- [21] Farndale R.W., Sayers C.A., Barrett A.J. A direct spectrophotometric microassay for sulphated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect. Tissue Res.* 1982, 9 pp. 247–248
- [22] Grande D.A., Halberstadt C., Naughton G., Schwartz R., Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 34 pp. 211–220
- [23] Hoemann C.D. Chapter 8: Molecular and Biochemical Assays of Cartilage Components. *Cartilage and Osteoarthritis vol. 2 Structure and In Vivo Analysis, Methods in Molecular Medicine*, F. De Ceuninck, M. Sabatini and P. Pastoureau (eds), Humana Press Inc., 2004
- [24] Hoemann C.D., Sun J., Chrzanowski V., Bushmann M. D., A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage. *Anal. Biochem.* 2002, 300 pp. 1–10
- [25] Kim Y. J., Sah R.L., Doong J.Y., Grodzinsky A. J. Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258. *Anal. Biochem.* 1988, 174 pp. 168–176
- [26] von der Mark K., van Menxel M., Wiedemann H. Isolation and characterization of new collagens from chick cartilage. *Eur. J. Biochem.* 1982, 124 pp. 57–62
- [27] Lee C.R., Grodzinsky A., Hsu H.P., Martin S.D., Spector M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J. Orthop. Res.* 2000, 18 pp. 790–799
- [28] Stone J., Akhtar N., Botchway S., Pennock C.A. Interaction of 1,9-dimethylmethylene blue with glycosaminoglycans. *Ann. Clin. Biochem.* 1994, 31 pp. 147–152
- [29] Treppo S., Koepp H., Quan E.C., Cole A.A., Kuettner K.E., Grodzinsky A.J. Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J. Orthop. Res.* 2000, 18 pp. 739–748
- [30] Bryant S. J., Anseth K. S. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 59 pp. 63–72