

Biomaterial Applied to Treatment Bone Defect in Dogs

Phingphol Charoonrut*

Faculty of Veterinary Science, Mahidol University, Salaya, Nakorn Pathom, 73170

*Corresponding author, E-mail address: vsper@mahidol.ac.th

Abstract

Biomaterial is the material that used for replace the tissue of any organ and has biocompatibility with the normal tissue. Biomaterials are widely used in human medicine, particularly in orthopedic and dental application. Biomaterials are synthetic polymers, ceramics, natural polymers and bone. In veterinary medicine, biomaterials are used to repair bone defects in dog but still in low of numbers. The uses of biomaterials in bone defects offers structure for scaffolding cellular invasion and provide biological case to guide bone regeneration. Almost data of biomaterial usage in dogs came from research works. Their general properties including mechanical and physiological have been described. Observation of biomaterial in clinical use is advised for any complication that may occur.

Keywords: Biomaterials, bone defects, scaffold, dogs

การใช้วัสดุชีวภาพเพื่อช่วยในการสร้างกระดูกทดแทนในสุนัข

พิงพล จรุงรัตน์*

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: vsper@mahidol.ac.th

บทคัดย่อ

วัสดุชีวภาพคือวัสดุที่สามารถใช้แทนเนื้อเยื่อส่วนหนึ่งส่วนใดของอวัยวะโดยที่ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกาย และสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ทดแทนในส่วนนั้นได้ ซึ่งวัสดุชีวภาพมีการใช้กันอย่างกว้างขวางในทางการแพทย์ โดยเฉพาะทางด้านทันตกรรมและออร์โธปิดิกส์ วัสดุชีวภาพเป็นวัสดุได้หลายประเภท เช่น สารพวกโพลีเมอร์สังเคราะห์ เซรามิก โพลีเมอร์จากธรรมชาติและเนื้อเยื่อกระดูก ในทางสัตวแพทย์นั้นมีการใช้วัสดุชีวภาพเพื่อการรักษาช่องว่างในเนื้อเยื่อกระดูกของสุนัข แต่ยังมีการใช้ในทางคลินิกค่อนข้างน้อย ซึ่งข้อมูลที่ได้ส่วนใหญ่จะมาจากงานวิจัยเป็นหลัก การใช้วัสดุชีวภาพเพื่อการรักษาช่องว่างในเนื้อเยื่อกระดูกนั้น จะช่วยให้เกิดโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการเจริญและเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์เพื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกและสร้างเนื้อเยื่อกระดูกต่อไป โดยบทความนี้ได้กล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะทางกลศาสตร์ต่างๆของวัสดุชีวภาพ แต่ในส่วนการใช้วัสดุชีวภาพในทางคลินิกนั้น จะต้องมีการศึกษาเพื่อติดตามสภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อไป

คำสำคัญ : วัสดุชีวภาพ, ช่องว่างกระดูก, สุนัข

บทนำ

ปัญหาหรือภาวะที่เนื้อกระดูกบางส่วนสูญหายไปหรือเกิดช่องว่างที่ตัวกระดูก (Bone defect) ในสุนัขนั้น อาจมีสาเหตุมาจากอุบัติเหตุ การผ่าตัดเนื้องอกที่กระดูกหรือการตัดต่อกระดูก (Osteotomy) เพื่อช่วยรักษาโรคที่ทำให้กระดูกผิดรูปร่าง หากช่องว่างของกระดูกที่เกิดขึ้นมีขนาดค่อนข้างใหญ่ การรักษาหรือการผ่าตัดด้วยวิธีทั่วไปอาจจะส่งผลให้การเชื่อมตัวของกระดูกเกิดได้ช้า (Delayed union) หรืออาจไม่เกิดการเชื่อมต่อของกระดูกเลย (non-union) ซึ่งการรักษาในสุนัขนั้นจะใช้การปลูกถ่ายกระดูก (bone graft) เป็นหลัก ซึ่งการปลูกถ่ายกระดูกนั้นเป็นรูปแบบหนึ่งของวัสดุชีวภาพ (Biomaterials) โดยชนิดของกระดูกที่นำมาปลูกถ่ายส่วนใหญ่เป็นชนิด Autograft แต่สำหรับ Allograft และ Xenograft นั้นยังมีการใช้ที่ไม่แพร่หลาย ในปัจจุบันทางการแพทย์ได้มีการนำเอาวัสดุชีวภาพ (biomaterials) อื่นๆ ที่ไม่ใช้การปลูกถ่ายกระดูกมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านทันตกรรมและออร์โธปิดิกส์ โดยวัตถุประสงค์ของการใช้วัสดุชีวภาพ คือ เพื่อช่วยให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ในบริเวณที่มีช่องว่างของกระดูกเกิดขึ้น โดยวัสดุชีวภาพต่างๆ ที่นำมาใช้ควรมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีการปลูกถ่ายกระดูกและเกิดผลข้างเคียงให้น้อยที่สุดโดยวัสดุชีวภาพเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง scaffold เพื่อให้ที่อยู่กับเซลล์ที่สามารถเจริญและสามารถเปลี่ยนรูป (osteoconduction) ไปเป็นเซลล์กระดูก วัสดุชีวภาพที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาช่องว่างของกระดูก เช่น synthetic polymers, ceramics เป็นต้น การใช้วัสดุชีวภาพเพื่อการรักษาช่องว่างของกระดูกของสุนัขในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในงานวิจัย เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับการใช้ประโยชน์ในมนุษย์มากกว่าการศึกษาเพื่อใช้ในสุนัขโดยตรง

วัสดุชีวภาพที่ใช้เพื่อช่วยการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก

1. การปลูกถ่ายกระดูก (Bone graft) นับเป็นส่วนหนึ่งของวัสดุชีวภาพและการปลูกถ่ายกระดูกเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการรักษาช่องว่างของกระดูกกันมากที่สุด ซึ่งลักษณะกระดูกที่นำมาปลูกถ่ายจะมี 2 รูปแบบ คือ cancellous และ cortical bone graft โดย cancellous bone graft จะมีลักษณะเป็นกระดูกที่มีรูพรุน (trabeculae bone) และมีเซลล์กระดูกอายุน้อยอยู่ในปริมาณสูงรวมถึงมีการตอบสนองต่อการเกิดเส้นเลือดใหม่ได้ดีกว่า cortical bone graft ดังนั้นจึงนิยมนำ

cancellous bone graft ไปใช้ในการรักษากระดูกที่มีการเชื่อมตัวช้า (delayed union) หรือกรณีเกิดการไม่เชื่อมตัวของกระดูก (non-union) หรือช่วยให้อายุการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกใหม่ได้เร็วขึ้นเช่นในกรณีการเชื่อมข้อต่อต่างๆ (arthodesis) แต่ปริมาณของ cancellous bone graft ที่ได้จะมีไม่มากนัก ส่วน cortical bone graft จะมีกระดูกส่วนที่เป็นโครงแข็ง (cortex) เป็นหลัก โดยจะได้มาจากส่วนที่เป็น diaphysis ของกระดูก long bone ทำให้มีเซลล์ที่เป็นเซลล์กระดูกอายุน้อยอยู่เพียงเล็กน้อยแต่สามารถใช้เพื่อคงความยาวและช่วยรับน้ำหนักได้บางส่วน จึงมักใช้ cortical bone graft เพื่อรักษาในกรณีที่มีช่องว่างกระดูกขนาดใหญ่ โดยการปลูกถ่ายกระดูกนั้นหากพิจารณาจากผู้ให้ (donor) จะสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ หลักคือ Autogenous bone graft (Autograft), Allograft และ Xenograft นอกจากนี้ยังมีการปลูกถ่ายกระดูกสังเคราะห์ (synthetic bone substitutes) ที่เรียกว่า alloplastic graft อีกรูปแบบหนึ่ง โดยรูปแบบกระดูกที่นำมาปลูกถ่ายที่เป็นแบบ Autogenous bone graft (Autograft) จะให้ผลการรักษาที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับกับปลูกถ่ายกระดูกรูปแบบอื่นๆ (Szentimrev et al. 1995; Fitch et al. 1997) autograft มีทั้ง cortical และ cancellous ซึ่งจากการศึกษาการปลูกถ่ายกระดูก cortical autograft 2 ลักษณะ คือ free bone graft และการปลูกถ่ายชนิดที่มีกล้ามเนื้อติดอยู่ (graft with muscle pedicles) พบว่าการปลูกถ่ายกระดูกชนิดที่มีกล้ามเนื้อติดอยู่จะมีการเชื่อมตัวที่ดีกว่า (Bell et al. 1985) แต่จะสามารถกระทำได้เฉพาะกรณีที่มีกระดูกอีกส่วนอยู่ใกล้เคียงกันเช่นกระดูก radius และ ulna และข้อดีอีกประการคือไม่เกิดภาวะแทรกซ้อนจากการต่อต้านของเนื้อเยื่อ การปลูกถ่ายกระดูกลักษณะนี้มีข้อดี 2 ประการ คือ มีโครงสร้าง scaffold และเซลล์กระดูกที่พร้อมในการสร้างกระดูกได้ทันทีและยังมีส่วนประกอบของ collagen type I ซึ่งช่วยให้เกิดการสร้างเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงกระดูกที่ปลูกถ่าย แต่ในการปลูกถ่ายกระดูกแบบ Autograft นั้นมีข้อด้อยในส่วนที่สัตว์จะต้องถูกผ่าตัดในส่วนอื่นอีกหนึ่งตำแหน่ง ส่งผลให้สัตว์ได้รับความเจ็บปวดเพิ่มขึ้นและเพิ่มระยะเวลาในการผ่าตัด อีกทั้งจะไม่สามารถดำเนินการผ่าตัดได้หากสุนัขมีสุขภาพไม่สมบูรณ์ (Rohanizadeh et al. 2008) ส่วนการปลูกถ่ายกระดูกอีก 2 แบบคือ การทำ Allograft เป็นการปลูกถ่ายกระดูกที่นำมาจากสุนัขตัวอื่น และอีกแบบหนึ่งคือ xenograft เป็นการปลูกถ่ายกระดูกที่ได้มาจากสัตว์ต่างชนิด โดยกระดูกที่จะนำไปปลูกถ่ายใน 2 แบบนี้ จะถูกเก็บรักษาใน 3 ลักษณะ คือ frozen,

freeze-dried และ freeze-dried demineralized จึงทำให้มีความสะดวกในการใช้งานมากกว่าการปลูกถ่ายกระดูกแบบ Autograft แต่ส่วนใหญ่มักจะถูกเก็บรักษาในลักษณะ demineralized จึงทำให้มีคุณสมบัติในการเป็น scaffold ให้เซลล์กระดูกเจริญได้น้อย โดยยังคงเหลือในเพียงส่วนของ Collagen Type I ซึ่งยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างเส้นเลือดเข้าไปเลี้ยงบริเวณที่ปลูกถ่ายกระดูกได้ ข้อดีของการปลูกถ่ายกระดูก ทั้งในแบบ Allograft และ Xenograft อีกประการคือ จะต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน เช่น ทดสอบถ่ายเพื่อตรวจหาโรคติดต่อต่างๆ และทำการฆ่าเชื้อด้วยรังสีอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งจากการทดลองใช้ Allograft ของสุนัขพบว่า การสร้างกระดูกยังให้ผลลัพธ์ที่ไม่ดี (Paskalev et al. 2006) ส่วนการใช้ Xenograft ที่มาจาก commercial demineralized purified natural bone graft of bovine origin (LUBBOC®) พบว่าไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านของเนื้อเยื่อและให้ผลในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกที่มีประสิทธิภาพ (Osailan 1996) ส่วนการใช้ Human Cancellous Xenograft ในสุนัขนั้นปัจจุบันยังไม่ประสบความสำเร็จ (Paskalev et al. 2006) สำหรับในส่วน alloplastic ซึ่งเป็นวัสดุสังเคราะห์ในหลายรูปแบบ เช่น synthetic hydroxyapatite ceramics, bioactive glass, deorganified bovine bone นั้นจะมีข้อดีคล้ายกับ allograft และ xenograft คือ ไม่ต้องมีการผ่าตัดเพิ่มในส่วนอื่นของร่างกาย รวมถึงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อกระดูก (osteoconduction) ได้ และจะต้องไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้านจากเนื้อเยื่อของร่างกาย (Jame Mah et al. 2004)

2. กลุ่ม Polymers ในกลุ่มนี้ปัจจุบันยังมีการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์ในสุนัขค่อนข้างน้อย สารประกอบในกลุ่มนี้ เช่น Polylactic acid (PLA) Polyglycolic acid (PGA) และ Copolymers ของ PLA กับ PGA (PLGA) (Xu et al. 2010) หรือสารพวก polyurethane สารประกอบเหล่านี้ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของวัสดุเย็บภายใน (suture materials) ซึ่งมีข้อดีที่ไม่เกิดการต่อต้านของเนื้อเยื่อ (non-immunogenic) ไม่เกิดพิษ และสามารถดูดซึมได้ (bioabsorbable) นอกจากนี้ สารกลุ่มนี้ยังสามารถนำไปใช้ร่วมกับสารอื่นที่มีโครงสร้าง scaffold ที่มีรูพรุนแต่มีการสลายที่ค่อนข้างเร็ว เช่น gelatin เพื่อให้เกิดการสลายที่ช้าลง แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เซลล์กระดูกจะเจริญได้น้อย เนื่องจากสาร PLGA เข้าไปแทรกอยู่ในรูพรุน ทำให้ช่องว่างหรือรูพรุนภายใน gelatin ลดลง (Rohanizadeh et al. 2008)

3. วัสดุ ceramic ที่มีโครงสร้าง 3 มิติได้ถูกนำมาใช้เพื่อรักษาช่องว่างในกระดูกกันค่อนข้างมากวัสดุ ceramic ในช่วงแรกมักจะเป็นพวก glass composition เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีสารประกอบที่คงตัวไม่ทำปฏิกิริยา (almost complete inert) ทำให้ไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านของเนื้อเยื่อ มีค่าสัมประสิทธิ์การขยายตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นมีค่าต่ำ เนื้อวัสดุมีความแข็งแต่แตก (brittleness) ได้ง่ายและมีข้อด้อยในส่วนที่จะเชื่อมสภาพเข้า ทำให้กระดูกไม่สามารถเข้าไปแทนที่ได้ทั้งหมด (Johnson et al. 1996) สาร ceramics ที่นิยมใช้คือ แคลเซียมฟอสเฟต (Calcium Phosphate) หรือที่รู้จักกันในชื่อ Hydroxyapatite (HA) ได้มีการนำมาใช้แทนการปลูกถ่ายกระดูกในศัลยกรรมกระดูกกันอย่างแพร่หลาย (Kohn and Ducheyne 1992) โดย hydroxyapatite สามารถผลิตได้โดยการทำให้เกิดการตกตะกอนของสารละลายที่มีแคลเซียมและฟอสเฟตไอออน (calcium phosphate) และยังมีผลผลิตเพื่อการค้าในรูปแบบที่สกัดมาจากกระดูก การสร้างกระดูกทดแทนเมื่อใช้แคลเซียมฟอสเฟตจะขึ้นกับปัจจัยหลัก คือ ขนาดของรูพรุน (porosity) Daculsi และ Passuti (1990) ได้ประเมินผลของขนาดรูพรุน (size of porosity) พบว่าขนาดของรูพรุนที่มีประสิทธิภาพต่อการเจริญของกระดูก จะมีขนาดประมาณ 100 μm นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบอีกประเภทคือ Synthetic hydroxylapatite (tricalcium phosphate, TCP) ซึ่งถูกผลิตมาเพื่อใช้ทางการแพทย์โดยเฉพาะ เนื่องจากสามารถดูดซึมได้ (resorbable form) และเมื่อถูกดูดซึมแล้วจะเหลือส่วนของแคลเซียมไว้ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของกระดูกต่อไป (Nascimento et al. 2007)

4. โพลีเมอร์จากธรรมชาติ ซึ่งสารโพลีเมอร์นี้ เป็นส่วนประกอบของกระดูก ฟัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่างๆ โดยสามารถสกัดมาจากสัตว์หรือมนุษย์ได้ สารโพลีเมอร์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Collagen, Gelatin, Hyaluronic acid และ Chitosan ซึ่งมีการศึกษาในการใช้รักษาช่องว่างของกระดูก สารในกลุ่มนี้มีข้อดีเหนือกว่าวัสดุสังเคราะห์ชนิดอื่น เนื่องจากเป็นสารประกอบโปรตีน (protein-derived materials) ทำให้มีความสามารถเข้าได้กับเนื้อเยื่อได้ดี (excellent biocompatibility) (Rohanizadeh et al. 2008) และลักษณะของสารประกอบพวก Collagen หรือ Gelatin จะมีโครงสร้างที่เป็น scaffold ได้ดีเนื่องจากมีรูพรุนค่อนข้างสูงแต่มีข้อด้อยคือสลายตัว (biodegradation) ได้ค่อนข้างเร็วจึงมักมีการเพิ่มสารประกอบอื่นเพิ่มไป เช่น collagen ร่วมกับ hydroxyapatite เพื่อให้มีความคงตัวมากขึ้นและเพิ่มความสามารถในการคง

รูปลักษณะโครงสร้าง 3 มิติได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับ collagen เพียงอย่างเดียว (Yamauchi et al. 2004) มีการเพิ่มสารประกอบอื่นเพื่อเสริมให้มีประสิทธิภาพ ภาพในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกได้ดีขึ้นเช่น การใช้ recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) (Faria 2007) หรือการใช้ Hyaluronic acid ร่วมกับ โพลีเมอร์ (Goodstone et al. 2004; Lin and Liu 2006)

ยังมีวัสดุชีวภาพอีกกลุ่มหนึ่ง คือ nanomaterial เป็นวัสดุที่มาจากโลหะ ceramic หรือโพลีเมอร์ โดยวัสดุเหล่านี้จะมีขนาดของส่วนที่เล็กที่สุดประมาณขนาด 1-100 นาโนเมตร เช่น nanostructure, nanocrystals, nanoparticle, nanofiber จากการศึกษาพบว่าวัสดุในกลุ่ม nanomaterial จะสามารถเพิ่มการตอบสนองของร่างกาย (biological response) เช่น ทำให้โปรตีนที่มีหน้าที่ยึดเซลล์ทำงานได้ดีขึ้น การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็นเซลล์สร้างกระดูก เพิ่มการผลิตและหลั่งสาร extracellular matrix molecule (Nair and Laurencin 2008) และเพิ่มการทำงานของเซลล์ osteoblast และ osteoclast ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุจำพวกเดียวกันแต่มีขนาดที่ใหญ่กว่า (micrometer-size) (Christenson et al. 2006; Dalby et al. 2006) แต่การศึกษาวัดในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่ยังไม่มีการศึกษาในสุนัขมากนัก

บทสรุปการใช้วัสดุทางชีวภาพเพื่อช่วยในการสร้างกระดูกทดแทน

วัสดุทางชีวภาพในปัจจุบันที่ใช้ในทางการแพทย์นั้น มีการคิดค้นวัสดุใหม่ๆที่มีความหลากหลายมากขึ้นและวัสดุในแต่ละประเภทก็จะมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างกันไป ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับผลของการสร้างกระดูกของวัสดุชีวภาพเหล่านี้ สำหรับในทางปฏิบัติที่ใช้ในการรักษาสุนัขที่มีปัญหาช่องว่างของกระดูกยังมีการนำไปใช้จริงค่อนข้างน้อย ซึ่งผลจากการทดลองต่างๆ แสดงให้เห็นว่า วัสดุทางชีวภาพเหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการสร้างกระดูกทดแทนได้ แต่การเลือกใช้วัสดุแต่ละประเภท อาจจะต้องพิจารณาในการรักษาแต่ละรายและยังคงต้องมีการศึกษาและรวบรวมข้อมูลต่อไปในส่วนของการรักษาในสุนัขป่วย เพื่อให้ได้ข้อมูลในการเลือกใช้วัสดุทางชีวภาพที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Bell S.N., Dooley B.J., O'Brien B. McC. and Bright N.F. (1985). Cortical Bone Grafts with Muscle Pedicles. *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 67(5). 804-808.
- Christenson E.M., Anseth K.S., Bencken V.D., Chan C.K., Batur Ercan, Jansen J.A., Laurencin C.T., Wan-Ju Li, Ramalingam Murugan, Nair L.S., Seeram Ramakrishna, Tuan R.S., Webster T.J., Mikos A.G. (2006) Nanobiomaterial Application in orthopedics. DOI 10. 1002/jor. 20305:11-22
- Dalby M.J., McCloy D., Robertson M., Wilkinson C.D., Oreffo R.O. (2006) Osteoprogenitor Response to Defined Topographies with Nanoscale Depths. *Biomaterials.* 27: 1306-15.
- Faria M.L.E., Lu Y. Heaney K., Uthamanthil R.K., Muir P. and Markel M.D. (2007). Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Absorbable Collagen Sponge Enhances Bone Healing of Tibial Osteotomies in Dogs. *Veterinary Surgery.* 36(2). 122-131.
- Fitch R., Kerwin S., Newman-Gage H., Sinibaldi K.K. (1997) Bone Autografts and Allografts in dogs . *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 19(5): 558-578
- Goodstone N.J., Cartwright A. and Ashton B. (2004) Effects of High molecular Weight Hyaluronan on Chondrocytes Cultured within a Resorbable Gelatin Sponge. *Tissue Engineering* 10(3): 621-631
- Hua Xu, Dong Han, Jia-Sheng Dong, Guo-Xiong Shen, Gang Chai, Zhe-Yuan Yu, Wei-Jun Lang and Song-Tao Ai (2010). Rapid Prototyped PGA/PLA Scaffolds in reconstruction of mandible condylar bone defects. *The International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery.* 6:66-72
- Johnson K.D., Frierson K.E., Keller T.S., Cook C., Scheinberg R., Zerwekh J., Meyers L. and Sciadini M.F. (1996). Porous Ceramics as Bone Graft Substitutes in Long Bone Defects : A Biomechanical, Histological, and Radiographic Analysis. *Journal of Orthopedics Research.* 14(3). 351-369.

- Kohn H.D. and Ducheyne P. (1992). Medical and Dental Materials In : Williams D.F. Eds., VCH, Weinheim., 14:30-109
- Nair L.S. and Laurencin C.T. (2008) Nanofiber and Nanoparticles for Orthopedic Surgery Application. *Journal of Bone and Joint Surgery* .90: 128-131
- Nascimento C., Oliveira R.R., Iyomasa M.M., Siessere S. and Regalo S.C.H. (2007). Biomaterials Applied to the Bone Healing Process. *Int. J. Morphol.* 25(4). 839-846.
- Oh T., Rahman M., Lim J., Park M., Kim D., Yoon J., Kim W.H., Kikuchi M., Tanaka J., Koyama Y. and Kweon O. (2006). Guide Bone Regeneration with beta-tricalcium phosphate and poly L-Lactide-co-Glycolide-co-Epsilon-caprolactone Membrane in Partial Defects of Canine Humerus. *Journal of Veterinary Science.* 7(1). 73-77.
- Osailan S.M. (1996). Application of Demineralized Purified Bovine Bone Graft in Craniomaxillofacial Deformities. Department of Biomedical Dental Science, College of Dentistry.
- Paskalev M., Krastev S., Mechkarski S. Philipov J. and Dyakova S. (2006). Experimental Study on Guided Bone Regeneration in Canine Segmental Ulnar Defects. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.* 9(4). 281-291.
- Rohanizadeh R., Swain M.V. and Mason R.S. (2008). Gelatin Sponges (Gefloam®) as a Scaffold for Osteoblasts. *Journal of Master Science.* 19. 1173-1182.
- Szentimrey D., Fowler D., Johnston G. and Wilkinson A. (1995). Transplantation of the Canine Distal Ulna as a Free Vascularized Bone Graft. *Veterinary Surgery.* 24(3). 215-225.
- Yamauchi K., Goda T., Takeuchi N., Einaga H. & Tanabe T. (2004) Preparation of collagen /calcium phosphate multilayer sheet using enzymatic mineralization. *Biomaterials*, 25(24): 5481-9
- Yung-Kai Lin and Deng-Cheng Liu (2006) Studies of Novel Hyaluronic Acid-collagen Sponge Materials Composed of Two Different Species of Type I collagen. *Journal of Biomaterial Application* . 1-17.