

บทความพิเศษ

หลักการพื้นฐานเกี่ยวกับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูก

อุกฤษ เหลืองภักทวงศ์

ภาควิชาสรีรวิทยา กองการศึกษา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

บทนำ

ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา นวัตกรรมทางการแพทย์พัฒนาอย่างก้าวกระโดดในหลายๆ ด้านโดยเฉพาะในด้านเทคโนโลยี และมีการศึกษา ลงลึกไปถึงระดับเซลล์ สารพันธุกรรม จนถึงระดับโมเลกุลของสาร ซึ่งหนึ่งในสาขาที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน คือ Regenerative Medicine เป็นสาขาวิชาที่กล่าวถึง การสร้างเซลล์ เนื้อเยื่อ หรือ อวัยวะขึ้นใหม่ ซึ่งประเด็นการศึกษาในอดีตที่ถูกกล่าวถึงอยู่บ่อยๆ อาทิ การศึกษาเกี่ยวกับ gene และ stem cell แต่ส่วนใหญ่มักได้ ผลการรักษาที่ไม่ดีเท่าที่ควร อาทิ stem cell ที่มีข้อเสียคือ ยังไม่มีวิธีในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้ง เซลล์ที่เพาะเลี้ยง ก็มีอัตรา การเจริญเติบโตที่ช้า อีกทั้งยังมีราคาแพง ส่วนการให้ยานั้นเน้นไปที่ Growth factor ที่เป็นยาที่ต้องฉีดเข้าทางกระแสเลือด ข้อเสียคือ ค่าครั้งชีวิตสั้น ทำให้ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์ประสาทได้นานพอ อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงกับร่างกาย ในระบบอื่น ๆ ด้วย จึงทำให้วิธีข้างต้นไม่สามารถนำมาใช้เป็นการ รักษาหลักได้ ดังนั้น จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้ความรู้เกี่ยวกับ Stem cell และ Growth factor ต่อยอดไปสู่สาขาวิชาใหม่ หนึ่งในนั้นคือ Tissue Engineering

ความคิดในการสร้างอวัยวะขึ้นมาใหม่เกิดขึ้นในช่วงสงครามโลก ครั้งที่ 2 โดยในปี ค.ศ. 1988 ที่การประชุมเชิงปฏิบัติการมูลนิธิ วิทยาศาสตร์แห่งชาติ(National Science Foundation) มีการใช้ คำว่า “วิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Tissue Engineering)” ถูกระบุอย่าง เป็นทางการเป็นตอนแรก¹ ซึ่งต่อมา วิศวกรรมเนื้อเยื่อ จะกล่าว เกี่ยวกับการสร้างวัสดุทดแทนสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการ²

หลักการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อ

Langer และ Vacanti ได้ให้คำจำกัดความเกี่ยวกับวิศวกรรม เนื้อเยื่อไว้ว่า วิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นการผนวกความรู้ในสาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ และวิศวกรรมเพื่อการพัฒนาสารทดแทนทาง

ชีวภาพ (Biomaterial) ซึ่งจะรักษา คงสภาพหรือปรับปรุงการทำงานของเนื้อเยื่อ³ โดยกระบวนการของวิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถสรุป เป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. การแยกเซลล์จากแหล่งที่มา ไม่ว่าจะเป็นเซลล์จากตัวผู้รับเอง (allogenic cells), autologous) หรือเซลล์จากสัตว์ (xenogenic cells) ซึ่งจะถูกระตุ้นให้เจริญเติบโตและแบ่งตัวในห้องทดลอง (โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ)
2. เซลล์ที่เก็บได้จะถูกนำไปไว้บน Biomaterial ทำหน้าที่เป็น โครงร่างและให้สารที่สำคัญแก่เซลล์ (สารอาหารและสารที่ช่วยในการเจริญของเซลล์ชนิดนั้นๆ)
3. หลังจากเซลล์พัฒนาได้เหมาะสมแล้ว จะทำการย้ายเซลล์ ไปยังผู้รับและแทนที่เนื้อเยื่อเก่าด้วยการสร้างเนื้อเยื่อใหม่⁴

วิศวกรรมเนื้อเยื่อสามารถทำได้หลายวิธี :

- การสร้างเนื้อเยื่อในห้องทดลองสำหรับการใช้งานในร่างกาย (In vitro tissue genesis for in vivo application)
- การสร้างเนื้อเยื่อในร่างกายสำหรับการใช้งานในร่างกาย (In vivo tissue genesis for in vivo application)
- การสร้างเนื้อเยื่อในห้องทดลองเพื่อการใช้งานที่มีการนำ เซลล์สิ่งมีชีวิตออกมามองร่างกาย (In vitro tissue genesis for ex vivo application)
- การสร้างเนื้อเยื่อในห้องทดลองสำหรับการใช้ในห้องทดลอง (In vitro tissue genesis for in vitro application)⁵

จากการค้นคว้าเพิ่มเติม พบว่า มีการศึกษาเกี่ยวกับ Tissue engineering สำหรับเพาะเนื้อเยื่อขึ้นมาใหม่ ซึ่งช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆ มากมาย อาทิ เนื้อเยื่อ กระดูก เนื้อเยื่อกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งศาสตร์เกี่ยวกับ Tissue engineering ใช้ความรู้เกี่ยวกับการกำเนิด, การเจริญเติบโตของ เซลล์, Biomaterial, 3D printing เข้ามาประกอบกัน หลักการคือ

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 3 กรกฎาคม 2563 แก้ไขบทความ 27 พฤศจิกายน 2563 ได้ตีพิมพ์เมื่อ 28 กุมภาพันธ์ 2564

ผู้พิมพ์หลัก: ร.ท.อุกฤษ เหลืองภักทวงศ์ แพทย์ใช้ทุนปีที่ 3 ภาควิชาสรีรวิทยา กองการศึกษา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 Email: aukritphysio@pcm.ac.th

ใช้ Biomaterial สร้างขึ้นเป็นโครงข่าย (Scaffold) เพื่อนำเซลล์ที่เก็บเกี่ยวมาเพาะลงไป ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนา Biomaterial ขึ้นมาหลายชนิดเพื่อให้เหมาะกับเนื้อเยื่อแต่ละประเภท ทั้งยังสามารถใส่สารประกอบหรือยาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวและเจริญเติบโตในแบบที่ต้องการ

โดยทั่วไป Biomaterial จะต้องมีความสมบัติพื้นฐาน ดังนี้

- **interactivity** คือ มีความสามารถในการกระตุ้นการฟื้นตัวสร้างเซลล์ใหม่ รวมทั้งเร่งอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์^{6,7}

- **Biocompatibility** คือ ต้องเข้ากับร่างกายมนุษย์ได้ มีผลข้างเคียงน้อย ทั้ง cytotoxicity, immunogenicity รวมทั้ง mutagenicity^{6,7}

- **Biodegradability** คือ สารดังกล่าวต้องสลายได้เองในเวลาที่เหมาะสม^{6,7} ขึ้นกับการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารต่างๆ ให้มีความสมบัตินี้⁸⁻¹⁰

- **Porosity** เนื่องจากโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูพรุนจะช่วยให้การเกาะและกระจายตัวของเซลล์ และยังทำให้การแลกเปลี่ยนแก๊ส, สารอาหารของเซลล์ และ extracellular fluid เกิดขึ้นได้ง่าย^{7,8}

- **Lack of swelling** ซึ่งเป็นข้อสำคัญที่ป้องกันการกดทับเนื้อเยื่อข้างเคียง¹³

- คุณสมบัติอื่นๆ อาทิ Injectability, shear-thinning, self-healing (thixotrophy) คือมีความสามารถในการเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลวในสภาวะที่มีแรงเค้น ทำให้สามารถฉีดเข้ารูร่างกายได้ง่าย และสามารถคืนสภาพกลับเป็นโครงสร้างเดิมเมื่อแรงเค้นหายไปในเวลาที่กำหนด^{11,12}

Bone Tissue Engineering

ในปัจจุบัน การใช้กระดูกปลูกถ่ายในตนเอง (Autologous bone graft; autograft) ยังคงเป็นวัสดุหลักในการผ่าตัดที่ต้องมีการทดแทนเนื้อเยื่อกระดูก เนื่องจากมีความสมบัติ 3 ข้อ คือ

1. **Osteoinductivity** : ความสามารถของวัสดุในการชักนำให้เกิดการสร้างกระดูกขึ้นใหม่ (de novo bone formation) โดยไม่ต้องมีปัจจัยเสริมในการสร้างกระดูก (Osteogenic factors)¹⁴

2. **Osteoconductivity** : ความสามารถของวัสดุในการทำหน้าที่เป็นโครงร่าง (scaffold) หรือแม่แบบเพื่อให้เกิดเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่ตามพื้นผิวของวัสดุนั้น ๆ¹⁵

3. **Osteogenic properties** : วัสดุนั้นๆ ประกอบด้วย viable

mesenchymal stem cells, osteoblasts, osteocytes และ osteogenic factors อื่นๆ โดยปัจจัยเหล่านี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างกระดูกต่อไป^{16,17}

อย่างไรก็ตาม autograft ยังมีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น ปริมาณกระดูกที่จะนำมาใช้เป็น graft มีจำกัด และการเจ็บป่วยจากการนำกระดูกส่วนนั้นออกมาทำ graft (โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ) ดังนั้นจึงมีการศึกษาหาวิธีการใหม่เพื่อลดข้อจำกัดของ autograft เช่น เนื้อเยื่อกระดูกจากผู้บริจาค (allograft) ที่มี osteoconductivity โดยมาในรูปของกระดูกแช่แข็ง (fresh frozen allograft) หรือในรูปแบบปราศจากแร่ธาตุ (demineralized allograft) ซึ่งวัสดุเหล่านี้ก็ยังมี osteoinductivity ที่น้อยกว่า autograft ข้อเสียที่เกี่ยวข้องกับการปลูกถ่ายกระดูก allogenic คือความเสี่ยงในการติดเชื้อที่อาจพบเมื่อเข้ามาใน graft นั้นๆ¹⁸⁻²² (เช่นเดียวกับ xenograft)

เนื่องจากข้อจำกัดเหล่านี้ วัสดุทดแทนกระดูก (Bone substitutes) จึงถูกพัฒนาขึ้น ซึ่ง bone substitute มีคำจำกัดความว่า “วัสดุ (ที่เกิดขึ้นจากสารสังเคราะห์ สารชีวโมเลกุล) ที่สามารถใช้ในการรักษากระดูกส่วนที่เสียไป โดยแทนการใช้ autogenous หรือ allogeneous bone”²³

Bone substitute ในอุดมคติควรมีคุณสมบัติ คือ เข้ากับร่างกายของผู้ป่วยได้ดี โดยไม่เกิดปฏิกิริยาต่อต้านหรือกระบวนการอักเสบใดๆ สามารถขึ้นรูปให้เข้ากับกระดูกส่วนที่เสียไปได้ง่าย มีความสมบัติ osteoconductive, osteoinductive²⁴ และสลายได้เอง สามารถติดตามวัสดุเหล่านี้ได้เมื่ออยู่ในร่างกาย (ด้วยการถ่ายภาพรังสีวินิจฉัย) และต้องมีความสมบัติทนความร้อน ไม่นำพาความร้อน (thermally nonconductive) สามารถฆ่าเชื้อได้ และมีราคาที่เหมาะสม²⁵

จากที่เราทราบเบื้องต้นว่า autograft เป็นการวัสดุหลักที่ใช้ในการผ่าตัดซ่อมแซมกระดูก ดังนั้น การสร้าง bone substitute จึงควรอ้างอิงจากคุณสมบัติและโครงสร้างของกระดูกมนุษย์

Bone Grafting Material for Bone Tissue Engineering

โครงสร้างของเนื้อเยื่อกระดูกนั้นมีการจัดลำดับที่ซับซ้อนมาก โดยเนื้อเยื่อกระดูกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะแบ่งเป็น cortical bone และ cancellous (trabecular) bone. Cortical bone พบใน shaft of long bones และ outer shell รอบๆ trabecular bone บริเวณส่วนต้นและส่วนปลายของกระดูกและกระดูกสันหลัง ส่วน trabecular bone จะอยู่ภายใน cortical tissue,

ใน medullary cavities ที่บริเวณส่วนปลายของ long bones, และ ภายในโครงสร้างของ short bone เช่น spinal vertebrae²⁶ ในระดับ sub-microscopic level, osteons และ trabeculae จะประกอบด้วยหน่วยย่อยที่สำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกคือ lamellae ส่วนในระดับ ultrastructural level, lamellae จะมี ส่วนประกอบหลักคือ mineral crystals และ collagen fibrils จากโครงสร้างที่กล่าวมาจะเป็นปัจจัยหลักในการเลือกวัสดุและพัฒนาวัสดุทดแทนกระดูก^{27,28}

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับ Bone substitute อย่างกว้างขวาง โดยมีการคิดค้นวัสดุหลากหลายชนิดเพื่อให้ได้วัสดุที่มีคุณสมบัติใกล้เคียง autograft มากที่สุด โดยวัสดุปลูกถ่าย (bone grafting material) ที่นำมาสร้าง Bone substitute ที่มีการศึกษาและใช้ในการรักษาในปัจจุบันแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม²⁹

1. Polymers

● Natural polymers พอลิเมอร์ธรรมชาติ เป็นพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยพอลิเมอร์ธรรมชาติเหล่านี้เป็นสิ่งที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นโดยอาศัยกระบวนการทางเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และมีการเก็บสะสมไว้ใช้ประโยชน์ตามส่วนต่างๆ พอลิเมอร์ธรรมชาติ อาทิ collagen, fibrin, gelatin, starch, hyaluronic acid หรือ chitosan มีคุณสมบัติเด่น คือ มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (good biocompatibility) และย่อยสลายได้เอง (biodegradability) ซึ่งปกติสารเหล่านี้พบได้ใน extracellular matrix อยู่แล้ว และบางชนิด เช่น starch หรือ chitosan ก็เป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ได้ง่าย ทำให้มีทรัพยากรเหลือเฟืออีกด้วย³⁰⁻³⁴ ยกตัวอย่างการศึกษาของ Johari B. และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับ three-dimensional nanocomposite Gelatin / Hydroxyapatite scaffold โดยในการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่ากับเซลล์ยึดเกาะกับ scaffold ได้ดีโดยไม่มี cytotoxicity จากนั้นจึงทดลองปลูกถ่ายใน Wistar rats ที่มี critical-size calvarial defect จำนวน 36 ตัว เมื่อเก็บตัวอย่าง calvarial defect 1, 4, and 12 สัปดาห์หลัง scaffold implantation พบว่า scaffold ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และเกิด ideal cellular attachment จากการนำตัวอย่าง calvarial defect มาวิเคราะห์เพิ่มเติม พบว่า ยังมี tissue coverage และ bone healing ค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตาม scaffold นั้นส่งเสริม osteoconduction และ osteogenesis อย่างมีนัยสำคัญ³⁵

อย่างไรก็ตามสารพอลิเมอร์ธรรมชาติส่วนใหญ่ยังมีคุณสมบัติเชิงกลไม่แข็งแรงเพียงพอสำหรับขึ้นส่วนกระดูกที่รับน้ำหนัก อีกทั้งวัสดุที่สังเคราะห์ออกมาอาจมีคุณสมบัติที่ไม่คงที่เพื่อป้องกันปัญหาเหล่านี้ต้องใช้เทคนิคเพิ่มเติมในการกำหนดคุณสมบัติของพอลิเมอร์ให้แม่นยำมากยิ่งขึ้น³⁶

● Synthetic polymers

จากข้อบกพร่องของพอลิเมอร์ธรรมชาติทำให้ในการศึกษาในปัจจุบันเน้นไปที่วัสดุที่เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ หรือพอลิเมอร์สังเคราะห์ร่วมกับพอลิเมอร์ธรรมชาติ เนื่องจากพอลิเมอร์สังเคราะห์มีคุณสมบัติเชิงกลที่แข็งแรงกว่า สามารถออกแบบโครงสร้างทางเคมีให้มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น ปริมาตรรูพรุน (porosity) ขนาดรูพรุน (pore size) ระยะเวลาย่อยสลาย (degradation rate) หรือคุณสมบัติเชิงกล เป็นต้น³⁷⁻³⁸ พอลิเมอร์สังเคราะห์ที่ใช้กันมากที่สุดคือ พอลิเมอร์ในกลุ่ม poly-(α -hydroxyacids) ยกตัวอย่างเช่น poly-glycolic acid (PGA), poly-lactic acid (PLA) และ poly-(ϵ -caprolactone). ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายของพอลิเมอร์เหล่านี้คือ glycolic acid และ lactic acid ซึ่งพบได้ตามธรรมชาติในร่างกายมนุษย์ดังนั้นจึงถูกกำจัดโดยวิธีการเผาผลาญตามธรรมชาติได้ การใช้ poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) ซึ่งเป็นโคพอลิเมอร์ที่เกิดจาก PLA และ PGA, polycaprolactone (PCL) เพื่อการฟื้นฟูกระดูกได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางและได้รับการรับรองสำหรับการใช้ทางคลินิกในมนุษย์โดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (American Food and Drug Administration)³⁹ อาทิ การศึกษา clinical trial ของ Schantz JT และคณะ⁴⁰ เลือกใช้ polycaprolactone (PCL) polymer เป็นวัสดุในการอุด burr hole หลังการทำ cranioplasty ในผู้ป่วย chronic subdural hematoma 5 ราย และติดตามผลการรักษาพบว่าวัสดุเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อกระดูกของผู้ป่วยได้เป็นอย่างดี ในด้านทันตกรรม Hoda N และคณะทดลองใช้ PLGA bioscaffold ในการอุดช่องเหงือกหลังการถอนฟัน (post-extraction socket) ในผู้ป่วย 10 ราย เทียบกับกลุ่มควบคุม 10 รายที่ไม่ได้ใช้ PLGA bioscaffold พบว่ากลุ่มทดลองมีความสูงของกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone height) น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เป็นตัวบ่งชี้ว่า PLGA มีส่วนช่วยในการลดการสลายของกระดูก (bone resorption)⁴¹

อย่างไรก็ตาม แม้คุณสมบัติเชิงกลของพอลิเมอร์สังเคราะห์จะดีขึ้น แต่ก็ยังไม่แข็งแรงเพียงพอ สำหรับใช้ในขึ้นส่วนกระดูกที่รับน้ำหนักได้ วัสดุเหล่านี้จึงถูกใช้ในบริเวณที่รับแรงน้อย (low

mechanical stress applications)³⁰ ข้อเสียที่ต้องระวังอีกประการหนึ่ง คือ ผลิตรากจากการย่อยสลายของพอลิเมอร์เหล่านี้ หากมีความเข้มข้นสูงจะทำให้บริเวณที่วัสดุฝังอยู่มีฤทธิ์เป็นกรดสูงสามารถส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของเซลล์ในโครงร่างในหลอดทดลองและอาจทำให้เกิดการการอักเสบในร่างกาย ยิ่งไปกว่านั้น การสลายตัวของพอลิเมอร์มักจะสลายเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กก่อน ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบเพิ่มเติมได้อีก⁴²

2. Ceramics

วัสดุเซรามิกโดยเฉพาะ Calcium phosphate ซึ่งอยู่ในรูปของ Calcium phosphate cements (CPCs) มีคุณสมบัติเป็น osteoconductivity, osteoinductivity, biocompatibility, and formability (ความสามารถในการเติมช่องว่างที่มีความซับซ้อน⁴³) และสามารถซ่อมแซมกระดูกได้เนื่องจากสารเหล่านี้เป็นแร่ธาตุหลักของเนื้อเยื่อกระดูกอยู่แล้ว อย่างไรก็ตาม Calcium Phosphate cement นั้นมีรูปพรุนน้อยมาก ทำให้ osteocyte ไม่สามารถยึดเกาะกับวัสดุได้และทำให้วัสดุสลายตัวได้ช้า จึงมีการศึกษาทดลองหาวิธีเพิ่มรูปพรุนโดยใช้สารต่างๆ อาทิ ผลึก soluble salts น้ำตาลชนิดต่างๆ พอลิเมอร์ที่ละลายน้ำได้ (เช่น ส่วนผสมของ α -tricalcium phosphate, dicalcium phosphate anhydrous, CaCO_3 , และ hydroxyapatite) โดยฉีดสารเหล่านี้เข้าไปใน CPCs แล้วค่อยนำสารเหล่านี้ออกเมื่อซีเมนต์แห้งแล้ว⁴⁴ หรือ การใช้สารที่ทำให้เกิดโฟม อาทิ ammonium hydrogen carbonate หรือ calcium carbonate⁴⁵ โดยสารเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับ CPCs ทำให้เกิด phosphoric acid เป็นผลให้เกิดฟองก๊าซ carbon dioxide และกลายรูปพรุนภายในซีเมนต์ในที่สุด ซึ่งนอกจาก Calcium phosphate ในรูปซีเมนต์แล้ว Calcium phosphate ยังสามารถผสมกับสารอื่นๆ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติต่างๆ เช่น hydroxyapatite ผสมกับ porous silicate substrate⁴⁶, biphasic calcium phosphate scaffold ที่มีทั้ง hydroxyapatite และ β /tri-calcium phosphate⁴⁷ Koshino และคณะ⁴⁸ ได้รายงานการใช้ porous hydroxyapatite [highly purified synthetic $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ wedge เพื่อใช้เป็น bone substitute สำหรับการผ่าตัด Open-wedge tibial osteotomy จำนวน 10 ครั้งในผู้ป่วย 7 ราย โดยจากการติดตามหลังการผ่าตัดที่ 1, 3, 6, 12, และ 36 เดือน พบว่า ในทุกเคสเกิดเนื้อเยื่อกระดูกขึ้นใหม่รอบๆ วัสดุ แสดงให้เห็นว่าวัสดุสามารถเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อกระดูกผู้ป่วยได้ดี

อย่างไรก็ตาม วัสดุประเภทเซรามิกยังมีข้อจำกัดในเรื่องความเปราะและความแข็งแรง ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาต่อไปในอนาคต

3. Metals

วัสดุประเภทโลหะนั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นวัสดุที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการผ่าตัดกระดูกเพราะเป็นวัสดุที่มีความแข็งแรง และสามารถเข้ากับบริเวณกระดูกที่ต้องรับน้ำหนักได้ดี³⁰ มีการทดสอบวัสดุโลหะที่มีรูปพรุน พบว่าเนื้อเยื่อกระดูกเข้ากับวัสดุเหล่านี้ได้ดี และสามารถงอกเข้าไปในรูปพรุนได้ ทำให้เกิดการยึดตรึงในเบื้องต้น (early fixation)⁴⁹ ซึ่งวัสดุที่มีนิยมนำมาการศึกษาได้แก่ titanium alloys^{50,51}, Porous tantalum or trabecular metal^{52,53} แต่ข้อเสียของวัสดุประเภทโลหะ คือ ขาดการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อข้างเคียงซึ่งนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนหลังการรักษาคือต้องผ่าตัดซ้ำเพื่อนำวัสดุเหล่านั้นออก⁵⁴ ซึ่งงานวิจัยหลายชิ้นรายงานว่าย่อยออกจากร่างกายโลหะหลายชนิด (อาทิ Ni-Ti, Co-Cr-Mo-Ni-Fe, stainless steel, Ti alloys, pure Ti) ทำให้เนื้อเยื่อรอบๆ วัสดุเกิดการบาดเจ็บ ส่งผลให้ผลการผ่าตัดแย่ลง หรือเกิดการอักเสบบริเวณผิวหนังโดยรอบอีกด้วย⁵⁵⁻⁵⁷

4. Composites

เป็นที่ทราบกันดีว่า วัสดุแต่ละประเภทยังมีข้อจำกัดทั้งในด้าน คุณสมบัติเชิงกล คุณสมบัติทางชีวภาพ ปริมาตรรูปพรุน หรือแม้แต่อัตราการย่อยสลายซึ่งส่งผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อกระดูกทั้งสิ้น⁵⁸ ทำให้การสร้างโดยใช้วัสดุเพียงชนิดเดียวทำได้ยากและอาจสิ้นเปลืองทรัพยากรโดยใช้เหตุ ดังนั้น การศึกษาในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปที่การผสมวัสดุเพื่อสร้างวัสดุทดแทนกระดูกที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น (โดยเรียกรวมวัสดุที่ผสมขึ้นใหม่ว่า composites) โดยรวมเอาข้อดีของวัสดุหลายชนิดเข้าไว้ด้วยกัน อาทิ biopolymers-reinforced 45S5 bioglass scaffolds⁵⁹, nano-hydroxyapatite/collagen composite⁶⁰, gelatin-bioactive glass hybrid scaffolds⁶¹, gelatin/siloxane hybrid composite⁶² เป็นต้น

สิ่งที่ต้องคำนึงเกี่ยวกับการสร้างวัสดุผสม คือ แม้จะเป็นการรวมข้อดีของวัสดุหลายชนิด แต่ก็เป็นการรวมข้อเสียของวัสดุเหล่านั้นด้วยเช่นกัน จึงต้องมีการศึกษาอย่างละเอียดก่อนการใช้งานทางคลินิก

5. Factor for adding osteoinductivity to bone grafting materials

● Stem cells

ปัจจุบันมีการใช้ stem cells มารักษาโรคโดยเฉพาะ

embryonic stem cells ที่สามารถเกิด differentiation ได้หลากหลายรูปแบบ จึงมีการทดลองใช้ปัจจัยต่างๆ เพื่อให้ embryonic stem cells เกิด differentiation ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น⁶³ ซึ่งมีผลการศึกษาที่น่าสนใจ อาทิ การศึกษาในผู้ป่วย 11 รายอายุ 52-79 ปีที่มีการสลายตัวของขอบขากรรไกรล่างอย่างรุนแรง (severe mandibular ridge resorption) ที่รักษาโดยใช้เซลล์ไขกระดูก (bone marrow-derived mesenchymal stromal cell; BMSC) จากยอดอู้งเชิงกรานด้านหลัง (posterior iliac crest) ร่วมกับ biphasic calcium phosphate granules แล้วปลูกถ่ายลงบริเวณใต้เยื่อหุ้มกระดูก (subperiosteal area of alveolar ridge) และประเมินการสร้างกระดูกใหม่จากการตรวจร่างกาย ภาพทางรังสีวิทยา การตรวจชิ้นเนื้อและประเมินความปลอดภัยทางคลินิกหลังการปลูกถ่าย 4-6 เดือน และประเมินประสิทธิภาพและความพึงพอใจของผู้ป่วยหลังการปลูกถ่าย 12 เดือน พบว่า BMSC กระตุ้นให้เกิดการสร้างกระดูกใหม่บริเวณขอบขากรรไกรล่างอย่างมีนัยสำคัญ⁶⁰ ซึ่งการใช้เซลล์ไขกระดูกของผู้ป่วยเองถือว่าเป็นวัสดุที่ใกล้เคียงกับเนื้อเยื่อกระดูกมากยิ่งขึ้น แต่การสร้างวัสดุที่มีเซลล์เหล่านี้จำเป็นต้องมีการทดสอบหลายขั้นตอน เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ การทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม เพื่อให้สามารถนำไปใช้ทางคลินิกได้อย่างปลอดภัย

● Growth factors

เมื่อมีการใช้ Stem cells ปัจจัยหนึ่งที่จะเหนี่ยวนำ stem cells ให้เกิด differentiation ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ก็คือ Growth factors สำหรับวัสดุทดแทนกระดูก มีการศึกษา Growth factors หลายชนิด อาทิ platelet-rich plasma (PRP)⁶⁵, vascular endothelial growth factor (VEGF)⁶⁶ หรือ bone morphogenic protein (BMP) โดยเฉพาะ BMP เป็นโปรตีนที่มีการศึกษามากว่ามีความสัมพันธ์ osteoinduction ต่อ MSCs, osteoblasts และ mature chondrocytes⁶⁷. ซึ่ง BMP-2 และ BMP-7 ได้รับการรับรองจาก the United States Food and Drug Administration (FDA) ให้ใช้ในทางคลินิกได้ โดย BMP-2 มีข้อบ่งชี้ในการรักษา acute setting ของ open tibial fracture ส่วน BMP-7 มีข้อบ่งชี้ในการรักษา long bone nonunion และ revision posterior lumbar fusion^{68,69} มีการศึกษาประวัติการรักษาย้อนหลัง(retrospective chart study) ในผู้ป่วยที่เข้ารับการผ่าตัด complex ankle arthrodesis ด้วย Ilizarov technique จำนวน 82 ราย โดยผู้ป่วยเหล่านี้มีปัญหายืดที่ส่งผลต่อการฟื้นตัวของ

กระดูก (มีโรคประจำตัว เช่น charcot neuropathy, rheumatoid arthritis, peripheral vascular disease, active malignancy เป็นต้น) โดยมีผู้ป่วย 42 รายที่ตามมาได้รับ recombinant human BMP-2 (rhBMP-2) ระหว่างการผ่าตัดเทียบกับผู้ป่วย 40 รายแรกที่ไม่ได้รับ rhBMP-2 พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับ rhBMP-2 มีแนวโน้มที่เนื้อเยื่อกระดูกมีการสมานตัว (fusion) หลังการผ่าตัดครั้งแรกมากกว่ากลุ่มควบคุม (93% เทียบกับ 53%, $p < 0.001$; OR, 11.76; 95%CI: 3.12-44.41) ใช้เวลาในการใส่อุปกรณ์ช่วยพยุงกระดูก (frame) น้อยลง (124 เทียบกับ 161 วัน, $p < 0.01$) และพบว่ามีการเชื่อมกระดูกมากขึ้นในการสแกน CT (48% เทียบกับ 32%, $p < 0.05$) ผู้ป่วยทุกรายที่มีการเชื่อมกระดูกมากกว่า 30% ที่สังเกตจากการสแกน CT 3 เดือนหลังผ่าตัดประสบความสำเร็จในการฟื้นตัวของกระดูกโดยไม่ต้องใช้การรักษาอื่นๆ มาช่วย⁷⁰

Mechanical Properties of Bone substitutes

กระดูกเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่สำคัญคือ เป็นโครงสร้างหลักของร่างกาย นอกจากชนิดของวัสดุปลูกถ่ายแล้วคุณสมบัติเชิงกล (mechanical properties) จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการสร้าง bone substitute ซึ่งเป้าหมายคือการสร้างวัสดุให้มีความสมบัติเชิงกลใกล้เคียงกับกระดูกมนุษย์ให้มากที่สุด ในที่นี้ขอยกตัวอย่างค่าทางฟิสิกส์ที่ใช้เป็นวัดคุณสมบัติเชิงกลอย่างแพร่หลายใน Bone Tissue Engineering นั่นคือค่า Young's modulus of elasticity

● Young's modulus of elasticity / elastic modulus

หมายถึง ความต้านทานเชิงกลของวัสดุในขณะที่ถูกยืดตัวหรือบีบอัด คำนวณเป็นขนาดของแรงต่อพื้นที่ผิว ใช้นิยามเป็นนิวตันต่อตารางเมตร (N/m^2) หรือ Paskal (Pa) ตารางใดที่ความสัมพันธ์ของความเครียด (stress-strain relation) เป็นแบบเชิงเส้น (linear- curve) การเสียรูปของวัสดุจะมีความยืดหยุ่นและกลับคืนรูปแบบเดิมเสมอหากไม่มีการใช้แรงอื่นมากระทำ⁷¹ ซึ่งเนื้อเยื่อกระดูกจะมีค่า Young's modulus of elasticity เช่นกัน โดยกระดูกประเภท cortical bone มี Young's modulus of elasticity ที่สูงกว่า cancellous bone³⁶ (ตารางที่ 1)

New Techniques and Trends of Bone Tissue Engineering

แม้ว่าจะมีวัสดุทดแทนกระดูกหลายชิ้นที่ถูกนำไปใช้ทางคลินิกแล้ว แต่วัสดุเหล่านั้นก็ยังมีข้อจำกัดบางประการและไม่สามารถใช้ได้กับกระดูกทุกส่วนในร่างกาย ปัจจุบันยังมีการพัฒนาวัสดุ

ตารางที่ 1 ค่า Young's modulus of elasticity ของวัสดุที่มีการศึกษาโดยสังเขป

วัสดุ	Young's modulus of elasticity (Pa)	แหล่งอ้างอิง
Tibial osteons	22.4×10^9	72
Cartilage	$1.6 - 6 \times 10^5$	73
Collagen	1.27×10^6	74
Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA)	$1.4 - 2.8 \times 10^9$	75
Titanium-based alloys	$55-115 \times 10^9$	76

ทดแทนกระดูกเพื่อให้ได้วัสดุที่ใกล้เคียงกับ autograft มากขึ้น ซึ่งทำได้หลายวิธี อาทิ Gelatin ที่ทราบกันดีว่าเป็นวัสดุที่มีข้อดีที่เป็น natural polymer เป็นพิษต่อเซลล์น้อยแต่มีข้อด้อยในด้านคุณสมบัติเชิงกล จึงมีการศึกษา Gelatin ในรูปแบบ composite เช่น การศึกษา Collagen/Gelatin/Hydroxyethyl Cellulose Composites แล้วใช้เทคนิคสร้างวัสดุขึ้นในรูป microsphere พบว่าทำให้วัสดุมีคุณสมบัติเชิงกลที่ดีขึ้นและความต้านทานต่อการสลายตัวสูงกว่าเมื่อเทียบกับ Collagen บริสุทธิ์หรือ Gelatin บริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว⁷⁷ นอกจากนี้ยังมีเทคนิคการเตรียมสารต่างๆ ก็มีส่วนสำคัญในการพัฒนาคุณสมบัติของวัสดุ เช่น เทคนิคการสร้างหมึกชีวภาพ (Bio-ink) และเทคนิคการพิมพ์วัสดุแบบ 3 มิติ (3D printing) ก็เป็นตัวอย่างเทคนิคที่ใช้ในหลายการวิจัย อาทิ การศึกษาวัสดุโครงร่างจาก Hydroxyapatite / Collagen ด้วยเทคนิค 3D printing เพื่อเลียนแบบโครงสร้างของกระดูกประเภท trabecular bone⁷⁸ และยังมีการค้นพบเทคนิคใหม่ ๆ อีกมากมายที่รอการทดสอบอยู่

สรุป

จากการศึกษาที่ได้นำมารวบรวมจะเห็นว่าวัสดุทดแทนกระดูกมีการพัฒนาไปมากบางชนิดมีการทดลอง ในทางคลินิกและใช้ในผู้ป่วยจริงแล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่มีวัสดุทดแทนกระดูกชนิดไหนที่สามารถทดแทนการใช้ autograft ได้ทั้งหมด และมีวัสดุที่น่าสนใจในการศึกษาอีกมากซึ่งผู้เขียนจะทำการศึกษาและนำเสนอข้อมูลในโอกาสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- O'Brien, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011;14(3):88-95.
- Lanza R, Langer R, Vacanti JP. *Principles of tissue engineering*. London: Academic Press; 2011.
- Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science. 1993;260(5110):920-6.
- Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(1):15-30.
- Irvine D. 20.462J Molecular Principles of Biomaterials [Internet]. Massachusetts: MIT OpenCourseWare;2006 [cited 2020 Nov 17]. Available from: <https://ocw.aprende.org/courses/biological-engineering/20-462j-molecular-principles-of-biomaterials-spring-2006/#>
- Kuznetsova D, Timashev PS, Bagratashvili VN, Zagaynova EV. Scaffold and cell system-based bone grafts in tissue engineering (Review). *Sovrem Tekhnologii Med*. 2014;6(4):201-11.
- Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(9):682-92.
- Carballo-Molina OA, Velasco I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:1-12.
- Zhang YS, Khademhosseini A. Advances in engineering hydrogels. *Science*. 2017;356(6337):eaaf3627.
- Ullah F, Othman MB, Javed F, Ahmad Z, Md Akil H. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;57:414-33.
- Guvendiren M, Lu HD, Burdick JA. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter*. 2012;(8):260-72.
- Niemczyk B, Sajkiewicz PL, Kolbuk D. Injectable hydrogels as novel materials for central nervous system regeneration. *J Neural Eng*. 2018;15(5):1-36.
- Lam J, Lowry WE, Carmichael ST, Segura T. Delivery of iPS-NPCs to the stroke cavity within a hyaluronic acid matrix promotes the differentiation of transplanted cells. *Adv Funct Mater*. 2014;24(44):7053-62.
- Makin M. Osteogenesis induced by vesical mucosal transplant in the guinea-pig. *Bone Joint J*. 1962;44(1):165-7.
- Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005;13(1):77-86.

16. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;151:294-307.
17. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
18. Khan SN, Cammisa FPJ, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005;13(1):77-86.
19. Manyalich M, Navarro A, Koller J, Loty B, de Guerra A, Cornu O, et al. European quality system for tissue banking. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2035-43.
20. Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77(11):1742-54.
21. Mroz TE, Joyce MJ, Steinmetz MP, Lieberman IH, Wang JC. Musculoskeletal allograft risks and recalls in the United States. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16(10):559-65.
22. Lomas R, Chandrasekar A, Board TN. Bone allograft in the UK: perceptions and realities. *Hip Int.* 2013;23(5):427-33.
23. Schlickewie W, Schlickewie C. The use of bone substitutes in the treatment of bone defects-the clinical view and history. *Macromol Symp.* 2007;253(1):10-23.
24. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *J Dent Res.* 2012;91(8):736-44.
25. Pryor LS, Gage E, Langevin CJ, Herrera F, Breithaupt AD, Gordon CR, et al. Review of bone substitutes. *Craniofac Trauma Reconstr.* 2009;2(3):151-60.
26. Martin RB, Burr DB. The structure, function, and adaptation of compact bone. California: Raven Press; 1989.
27. Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. *Skeletal Tissue Mechanics.* New York: Springer; 1998.
28. Schaffler MB, Burr DB. Stiffness of compact bone: effects of porosity and density. *J Biomech.* 1988;21(1):13-6.
29. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone.* 2015;(81):112-21.
30. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;(26):5474-91.
31. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743-65.
32. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W. Biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2006;32(2):114-24.
33. Hayashi T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Progress in Polymer Science.* 1994;19:663-702.
34. Ahmed AE, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):199-215.
35. Johari B, Ahmadzadehzarabad M, Azami M, Kazemi M, Soleimani M, Kargozar S, et al. Repair of rat critical size calvarial defect using osteoblast-like and umbilical vein endothelial cells seeded in gelatin/hydroxyapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(7):1770-8.
36. Wu S, Liu X, Yeung KWK, Liu C, Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng R Rep.* 2014;80:1-36.
37. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work: review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2003;5:29-40.
38. Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol.* 2010;101(22):8493-501.
39. Félix Lanao RP, Jonker AM, Wolke JG, Jansen JA, van Hest JC, Leeuwenburgh SC. Physicochemical properties and applications of poly (lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(4):380-90.
40. Schantz JT, Lim TC, Ning C, Teoh SH, Tan KC, Wang SC, et al. Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: technical case report. *Neurosurgery.* 2006;58 (Suppl 1):ONS-E176.
41. Hoda N, Saifi AM, Giraddi GB. Clinical use of the resorbable bioscaffold poly lactic co-glycolic acid (PLGA) in post-extraction socket for maintaining the alveolar height: A prospective study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(3):173-8.
42. Santavirta S, Kontinen YT, Saito T, Grönblad M, Partio E, Kemppinen P, et al. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72(4):597-600.
43. Liu X, Wei D, Zhong J, Ma M, Zhou J, Peng X, et al. Electrospun Nanofibrous P(DLLA-CL) Balloons as Calcium Phosphate Cement Filled Containers for Bone Repair: in Vitro and in Vivo Studies. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(33):18540-52.
44. Del Real R, Wolke J, Vallet-Regi M, Jansen J. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials.* 2002;23(17):3673-80.
45. Lindner M, Schickle K, Bergmann C, Fischer H. Ensuring defined porosity and pore size using ammonium hydrogen carbonate as porosification agent for calcium phosphate scaffolds. *Bio Nano Mat.* 2013;14(1-2):101-8.

46. Perez RA, Del Valle S, Altankov G, Ginebra MP. Porous hydroxyapatite and gelatin/hydroxyapatite microspheres obtained by calcium phosphate cement emulsion. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2011;97(1):156-66.
47. Roohani-Esfahani SI, Nouri-Khorasani S, Lu Z, Appleyard R, Zreiqat H. The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite-PCL composites. *Biomaterials.* 2010;31(21):5498-509
48. Koshino T, Murase T, Takagi T, Saito T. New bone formation around porous hydroxyapatite wedge implanted in opening wedge high tibial osteotomy in patients with osteoarthritis. *Biomaterials* 2001; 22(12):1579-82.
49. Matassi F, Botti A, Sirleo L, Carulli C, Innocenti M. Porous metal for orthopedics implants. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2013;10(2):111-5.
50. Bahraminasab M, Sahari BB, NiTi Shape Memory Alloys, Promising Materials in Orthopedic Applications, in Shape Memory Alloys - Processing, Characterization and Applications. In: Francisco Manuel Braz Fernandes. *Shape Memory Alloys: Processing, Characterization and Applications.* London: InTechOpen; 2013. p. 261-78.
51. Tan XP, Tan YJ, Chow CSL, Tor SB, Yeong WY. Metallic powder-bed based 3D printing of cellular scaffolds for orthopaedic implants: A state-of-the-art review on manufacturing, topological design. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;76:1328-43.
52. Bobyn JD, Stackpool GJ, Hacking SA, Tanzer M, Krygier JJ. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(5):907-14.
53. Wang N, Li H, Wang J, Chen S, Ma Y, Zhang Z. Study on the anticorrosion, biocompatibility, and osteoinductivity of tantalum decorated with tantalum oxide nanotubes array films. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2012;4(9):4516-23.
54. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1970;4(3):433-56.
55. Okazaki Y, Gotoh E. Metal release from stainless steel, Co-Cr-Mo-Ni-Fe and Ni-Ti alloys in vascular implants. *Corrosion Science.* 2008;50(12):3429-38.
56. Kanaji A, Orhue V, Caicedo MS, Viridi AS, Sumner DR, Hallab NJ, et al. Cytotoxic effects of cobalt and nickel ions on osteocytes in vitro. *J Orthop Surg Res.* 2014;9(1):91.
57. Zhao J, Chen L, Yu K, Chen C, Dai Y, Qiao X, et al. Biodegradation performance of a chitosan coated magnesium-zinc-tricalcium phosphate composite as an implant. *Biointerphases.* 2014;9(3): 031004.
58. Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2015;5:17059.
59. Yang G, Yang X, Zhang L, Sun X, Chen X, Gou Z. Counterionic biopolymers-reinforced bioactive glass scaffolds with improved mechanical properties in wet state. *Materials Letters.* 2012;75:80-3.
60. Gjerde C, Mustafa K, Hellem S, Rojewski M, Gjengedal H, Yassin MA, et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):1-15.
61. Gao C, Rahaman MN, Gao Q, Teramoto A, Abe K. Robotic deposition and in vitro characterization of 3D gelatin- bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(7): 2027-37.
62. Lei B, Shin KH, Koh YH, Kim HE. Porous gelatin-siloxane hybrid scaffolds with biomimetic structure and properties for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(7):1528-36.
63. Gallacher L, Murdoch B, Wu D, Karanu F, Fellows F, Bhatia M. Identification of novel circulating human embryonic blood stem cells. *Blood.* 2000;96(5):1740-7.
64. Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, Van den Bos C, Gordon S, Kraus, K, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(10):1927-35.
65. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(12):721-30.
66. Hasan A, Paul A, Memic A, Khademhosseini A. A multilayered microfluidic blood vessel-like structure. *Biomedical Microdevices.* 2015;17(5):88.
67. Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, et al. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone.* 2003;33(3):362-71.
68. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis.* 2012;8(4):114-24.
69. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:64-73.
70. Fourman MS, Borst EW, Bogner E, Rozbruch SR, Fragomen AT. Recombinant human BMP-2 increases the incidence and rate of healing in complex ankle arthrodesis. *Clin Orthop Relat Res.* 2014;472(2):732-9.
71. Vinckier A, Semenza G. Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Letters.* 1998;430(1-2):12-6.

72. Weisenhorn AL, Khorsandi M, Kasas S, Gotzos V, Butt HJ. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*. 1993;4(2):106-13.
73. Rho JY, Tsui TY, Pharr GM. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials*. 1997;18(20):1325-30.
74. Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In: vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials*. 2006;27(18):3466-72.
75. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413-31.
76. He G, Liu P, Tan Q. Porous titanium materials with entangled wire structure for load-bearing biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;5(1):16-31.
77. Kozłowska J, Stachowiak N, Sionkowska A. Collagen/gelatin/hydroxyethyl cellulose composites containing microspheres based on collagen and gelatin: Design and evaluation. *Polymers (Basel)*. 2018;10(4):456.
78. Li Q, Lei X, Wang X, Cai Z, Lyu P, Zhang G. Hydroxyapatite/Collagen Three-Dimensional Printed Scaffolds and Their Osteogenic Effects on Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. 2019;25(17-18):1261-71.

