مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال هفتم، شماره چهارم، پیاپی بیست و هشتم، بهار ۱۳۹۸ (۱۰۶-۹۹)

بررسی هیستوپاتولوژیک اثر غشای داخلی تخم‌مرغ بر روی ترمیم استخوان درشت‌نی در مدل حیوانی سگ

وحید ملیانیان[۱]، الهام مقتدایی خوراسگانی[۲*]
۱. دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استادیار، بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۲۵)

چکیده
امروزه آسیب‌های سیستم اسکلتی- عضلانی انسان و روند ترمیم آنها از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. ماده‌ای که بتواند از عفونت در شکستگی‌های باز جلوگیری، مدت زمان درمان را کاهش و ترمیم بافت استخوان را تسریع کند، مقرون به‌صرفه بوده و از اولویت استفاده برخوردار خواهد بود. غشای داخلی پوسته تخم‌مرغ به‌عنوان ترکیب کاملاً طبیعی، باعث افزایش جذب کلسیم شده و روند ترمیم بافت استخوان را تسریع می‌بخشد. در این مطالعه که بر روی استخوان درشت‌نی ۸ قلاده سگ انجام گرفت برشی به طول ۱۰ سانتی متر در استخوان درشت‌نی ایجاد و با کنار زدن عروق و اعصاب و برش در پرده ضریع با استفاده از دریل و مته حفرات به قطر ۸ میلی‌متر در ناحیه میانی استخوان درشت‌نی ایجاد کردیم. بیومتریال مورد نظر توسط پنس دندان موشی از محیط استریل خارج و در استخوان جاسازی شد. مقاطع بافتی در دوره‌های صفر، ۳۰ و ۶۰ روز پس از جراحی از نظر هیستوپاتولوژیک مورد ارزیابی واقع شدند.نتایج حاصل از میزان تغییرات استئوپلازی نیز نشان داد هر دو گروه کنترل و تیمار از روز صفر تا ۶۰ یک روند استخوان‌سازی روبه افزایش را داشته‌اند که این میزان در گروه تیمار در همه روزها سطح آن بالاتر از گروه کنترل بود. میزان استخوان‌سازی نیز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل رو به افزایش بود. نتایج حاصل از میزان تغییرات کندروپلازی نیز بیانگر آن بود که در هردو گروه یک روند روبه کاهش را در میزان کندرو پلازی شاهد بودیم.

واژه‌های کلیدی: بررسی آسیب شناختی، غشای داخلی تخم‌مرغ، استخوان درشت‌نی، استئوپلازی.

Histopathological examination of egg internal membrane on the healing of the tibia bone in the animal model of the dog

Vahid Molianian[1], Elham Moghtadaiee Khorasgani[2*]
1. Ph. D., Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
(Received: Nov. 7, 2017 - Accepted: Apr. 14, 2019)

Abstract
Nowadays the damages of the human musculoskeletal system and its healing process are crucially important. The material with the capability of prevention from infection in open fractures, reduction of treatment duration, and repair of bone tissue is economical, and it would be prioritized in usage. The egg internal membrane as a completely natural compound causes an increase in calcium absorption and accelerates the bone tissue repair process. The current study was conducted on the tibia bone of eight dogs. A cut of 10 cm length was developed in the tibia bone. 8 mm diameter cavities were developed in the mid area of the tibia bone by removing the vessels and nerves and cutting in Periosteum using the drill. The respective biomaterial was removed out of the sterile environment by Mouse-tooth forceps, and it was inserted into the bone. The tissue sections were evaluated in terms of histopathology at 0, 30, and 60 days after surgery. The results of osteoplastic changes also indicated that both control and treatment groups had an ascending bone formation process from day 0 to 60, which it was higher in all days in the treatment group compared to the control group. The bone formation level was increasing in the treatment group compared to the control group. The results obtained from Chondroplasic changes also indicated that in both groups there was a decreasing trend in Achondroplasia.

Keywords: Egg internal membrane, Histopathological examination, tibia bone, osteoplasia.

* نویسنده مسئول: الهام مقتدایی خوراسگانی E-mail: moghtadaiee@gmail.com

مقدمه

شکستگی‌های استخوانی به‌دلیل ایجاد اختلال در عملکرد حیوان، باعث کاهش راندمان تولید، بهره‌وری و کارایی در حیوانات مختلف شده و همچنین از لحاظ حمایت از حیوانات به‌خصوص حیواناتی که ارزش اقتصادی دارند، از اهمیت بالایی برخوردارند (Bax *et al*., 1999). مشکلات ارتوپدی، در بردارندهی عوارضی چون اختلال در سیستم ماهیچه‌ای نظیر تغییر سایز بر اثر کاهش یا عدم رشد اندام، عدم انعطاف‌پذیری عضو درگیر و مرگ بافتی و یا حتی بر روی اشتهای حیوان اثرگذاشته و منجر به ضعف و لاغری مفرط در حیوان میشود (Ercan *et al*., 2007).

استخوان‌سازی، القای استخوانی و هدایت استخوانی سه عامل اساسی مابین استخوان میزبان و پیوند استخوان می‌باشند که در بازسازی استخوان دخالت دارند (Kumar & Fasto, 2007). عضو ناکار آمد در رفتار و روش زندگی حیوان تأثیر گذاشته و منجر به عوارضی نظیر کاهش اشتها، تحلیل قوای جسمانی، کاهش راندمان تولید در حیوانات صنعتی و اقتصادی و همچنین باعث ناکارآمدی حیوانات مسابقه از لحاظ جسمانی شده به‌طوری‌که صاحبان مجبور به حذف حیوان خود می‌شوند و علت، تنها عدم ترمیم یا ترمیم ناقص و یا دیرهنگام استخوان می‌باشد. با توجه به شرایط موجود در حیوانات، سرعت درترمیم شکستگی‌ها، یکی از فاکتورهای مهم بوده به این خاطر که حیوانات پس از جراحی و ثابت نمودن عضو آسیب‌دیده دوران درد را به‌زودی طی نموده و اقدام به حرکات پیش‌بینی نشده می‌نمایند و اغلب اوقات توجهی به اندام آسیب‌دیده نداشته و باعث به‌هم‌ریختن نوع ترمیم و ثابت‌کننده‌های مورد استفاده در انواع شکستگی‌ها می‌گردند (Theresa, 2007).

امروزه برای کمک به ترمیم استخوان‌ها در موارد شکستگی‌ها و جراحت‌های سنگین که در آن استخوان‌ها به اشکال مختلف از هم جدا می‌شوند، نظیر شکستگی‌های مارپیچی، قطعه‌ای و ... از ایمپلنت‌های استخوانی شامل پلیت‌ها و پیچ‌های مخصوص برای ثابت نگه‌داشتن عضو درگیر استفاده می‌شود (Laughlin & Scott, 2003).

پودر خالص‌شده غشای پوسته تخم‌مرغ حاوی بیش از ۱٪ گلوگوزآمین برحسب وزن خشک، بیش از ۲٪ کوندرویتین سولفات، بیش از ۲٪ هیالورونیک اسید و بیش از ۲۵٪ کلاژن از نوع I می‌باشد. استفاده از غشای طبیعی پوسته تخم‌مرغ روش مطمئن و مؤثر جدید برای درمان درد و انعطاف‌پذیری مفاصل و ناهنجاری‌های بافت پیوندی می‌باشد محققان بیان نمودند که مصرف خوراکی غشای طبیعی پوسته تخم‌مرغ به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در روز در طول ۴ هفته سبب افزایش ۴۳/۷ درصدی انعطاف‌پذیری مفاصل و کاهش ۷۵/۹ درصدی درد مفاصل هنگام حرکات مفاصل در بیماران مبتلا به مشکلات مفاصل شده است.

غشای داخلی تخم‌مرغ به‌عنوان یک بیومتریال مانع از ایجاد تداخلات آماسی و بافتی در بافت استخوان و پرده ضریع و عضلات اطراف ناحیه جراحت شده و به ترمیم سریع استخوان در ناحیه غشای خارجی کمک می‌نماید (Laughlin & Scott, 2003).

لذا هدف از این مطالعه بررسی آسیب‌شناختی اثر غشای داخلی تخم‌مرغ بر روی ترمیم استخوان درشتنی در سگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر بر روی ۸ قلاده سگ بومی با میانگین سنی ۲ تا ۳ سال و وزن تقریبی قرار گرفت. سلامت عمومی سگ‌ها از نظر بیماری‌های انگلی و مشترک و درمان آنتی‌بیوتیکی جهت جلوگیری از عفونت‌های احتمالی به‌مدت ۵ روز انجام شد. همچنین واکسیناسیون علیه بیماری هاری و درمان ضدانگلی نیز صورت گرفت. قبل از شروع جراحی سلامت استخوان درشتنی با تهیه رادیوگراف مورد ارزیابی قرار گرفت. سگ‌ها به ۲ گروه

تیمار و کنترل تقسیم شدند. سپس سگ‌ها را با استفاده از دهان‌بند مقید شده و با داروی آسپرومازین ۰/۲ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن حیوان و کتامین با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن حیوان بیهوش شدند. برای آماده‌سازی غشای داخلی تخم‌مرغ ابتدا یک تخم‌مرغ (نژاد لگهورن) که بهترین نوع مرغ تخم گذار محسوب می‌شود را انتخاب کرده سپس با بتادین ضد عفونی و کلیه محتویات آن تخلیه شد. توسط دستگاه اولترا سونیک غشا را از پوسته آهکی سخت جدا نموده و با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده، سپس در آون خشک نموده و با گاز اتیلن اکساید استریل کرده و در سرم فیزیولوژی نگهداری شد. به این منظور برشی به طول ۱۰ سانتی‌متر در استخوان درشت‌نی ایجاد و با کنار زدن عروق و اعصاب و برش در پرده ضریع با استفاده از دریل و مته حفرات به قطر ۸ میلی‌متر در ناحیه میانی استخوان جهت جایگزین کردن ماده مورد نظر ایجاد کردیم. بیومتریال مورد نظر توسط پنس دندان موشی از محیط استریل خارج و در استخوان جاسازی شد. در انتها به‌واسطه نخ نایلون ۰/۲ بخیه ساده سرتاسری بر روی پوست و بافت همبند زیرین آن زده، با بتادین پوست ضد عفونی و پانسمان شد (شکل‌های ۱ و ۲).

نمونه‌برداری در طی روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ از سگ‌ها صورت گرفت. سگ‌ها بیهوش شده و ماده فیکساتور پارا فرم‌آلدئید ۰/۴ درصد در فسفات بافر نمکی وارد بدن حیوان شد. نمونه‌های برداشت‌شده توسط محلول اسید فرمیک ۱۰ درصد، اسید سیتریک ۲/۹ درصد و تری سدیم سیترات ۱/۸ درصد به‌مدت ۲ هفته در حرارت محیط کلسیم‌گیری شدند. مقاطع بافتی تهیه‌شده از بافت مورد نظر توسط میکروسکپ (OLYMPUS) مورد مطالعه قرار گرفتند. همچنین نتایج به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون T.test و ANOVA یک‌طرفه، مورد تجزیه و تحلیل در دو گروه تیمار و کنترل قرار گرفت و تفاوت بین میانگین‌ها با (P Value<۰/۰۱) معنی‌دار گزارش شد.

شکل ۱. بخیه پوست بعد از جایگزینی بیومتریال

شکل ۲. ایجاد حفره با استفاده از مته ارتوپدی در استخوان درشت‌نی

نتایج

مقاطع بافتی تهیه‌شده پس از گذشت صفر، ۳۰ و ۶۰ روز از شروع مطالعه به وسیله دستگاه میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت و مطابق روش امتیازدهی Lane & Sandhu (1987) ارزیابی شد که نتایج ذیل را در برداشت.

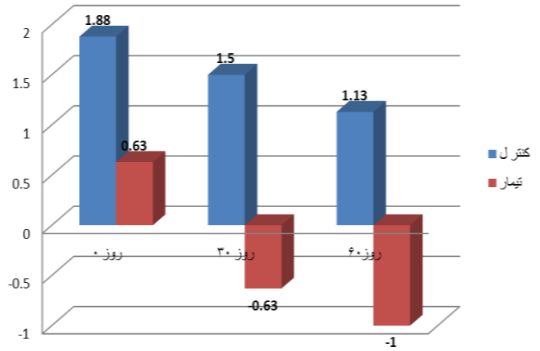
نتایج حاصل از میزان تغییرات فیبروپلازی در نمودار ۱ بیانگر این بود که روز صفر وسی وشصت میزان فیبروز گروه تیمار پایینتر از گروه کنترل بود که در گروه کنترل میزان کاهش فیبروپلازی در روز شصت نسبت به روز صفر و سی یک اختلاف معنی‌دار را نشان داد ($p < ۰/۰۱$).

نتایج حاصل از میزان تغییرات استئوپلازی در نمودار ۲ نیز نشان داد هر دو گروه کنترل و تیمار از روز صفر تا ۶۰ یک روند استخوان‌سازی رو به افزایش را داشته اندکه این میزان در گروه تیمار در همه روزها سطح آن بالاتر از گروه کنترل بود ($p < ۰/۰۱$).

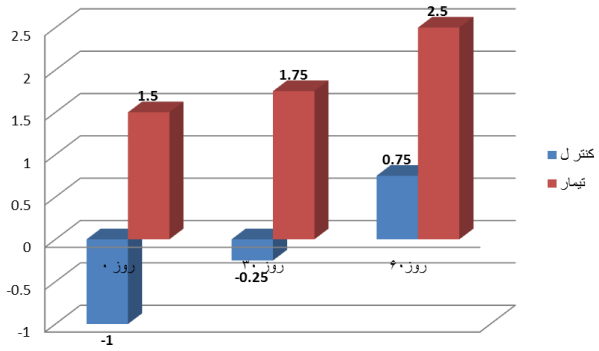
همچنین نتایج حاصل از میزان تغییرات التهاب در نمودار ۳ نشان داد میزان التهاب در گروه کنترل از روز صفر تا روز سی‌ام یک کاهش تدریجی داشت ولی نسبت به روز ۶۰ این کاهش معنی‌دار و شدید شد و در گروه تیمار از روز صفر تاروز سی‌ام میزان التهاب رو به کاهش ولی از روز ۳۰ تا ۶۰ دوباره افزایش پیدا کرد و هیچ اختلاف معنی‌داری در کاهش میزان التهاب بین روزهای صفر و ۳۰ و ۶۰ در گروه تیمار مشاهده نشد ($p < ۰/۰۱$).

نتایج حاصل از میزان تغییرات کندروپلازی در نمودار ۴ نیز بیانگر آن بود که در هر دو گروه یک روند روبه کاهش را در میزان کندرو پلازی شاهد بودیم ($p<۰/۰۱$) در گروه کنترل میزان کاهش کندروپلازی از روز صفر تا ۳۰ یک روند تدریجی بود اما یک اختلاف معنی‌داری را بین روز صفر و ۳۰ با روز ۶۰ نشان می‌داد ($p<۰/۰۱$).

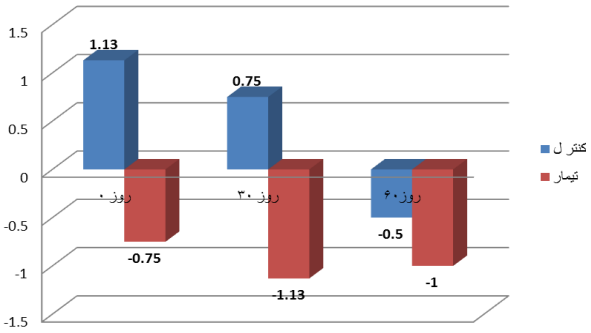
نتایج هیستوپاتولوژیک در شکل‌های ۳ تا ۸ نشان داده شده است.



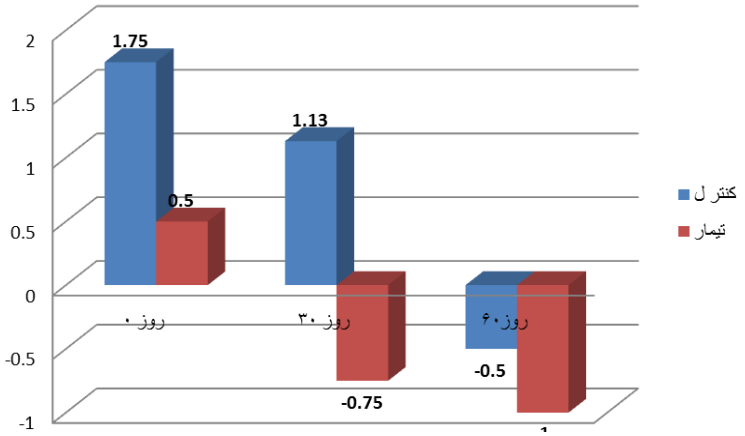
نمودار ۱. میزان تغییرات فیبروپلازی گروه‌های تیمار و کنترل در روزهای مختلف



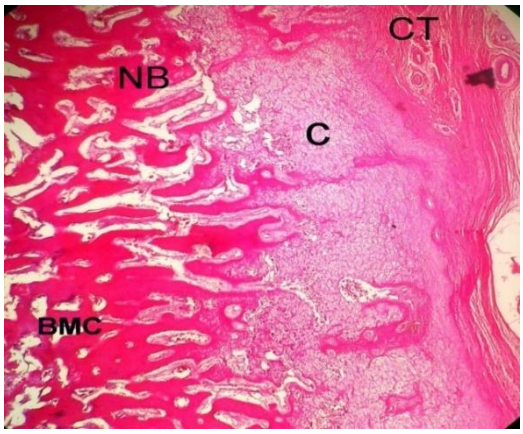
نمودار ۲. میزان تغییرات استئوپلازی گروه‌های تیمار و کنترل در روزهای مختلف



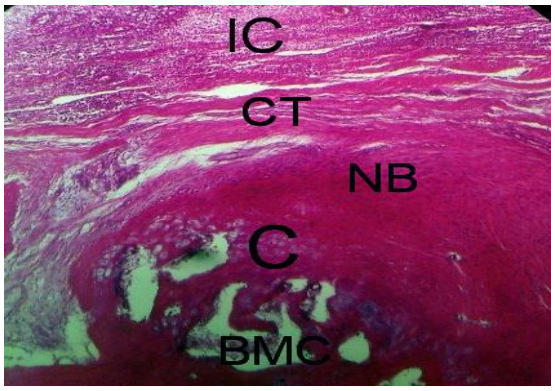
نمودار ۳. میزان تغییرات التهاب گروه‌های تیمار و کنترل در روزهای مختلف



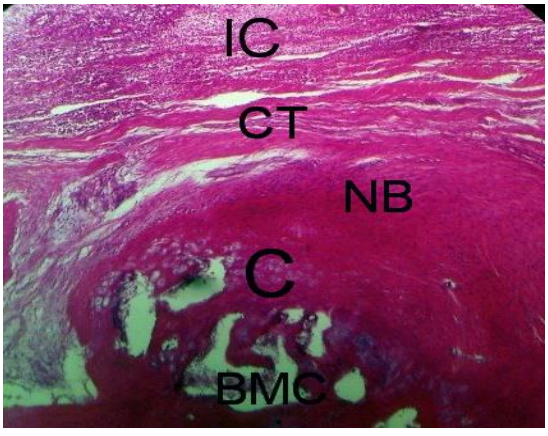
نمودار ٤. میزان تغییرات کندروپلازی گروه‌های تیمار و کنترل در روزهای مختلف



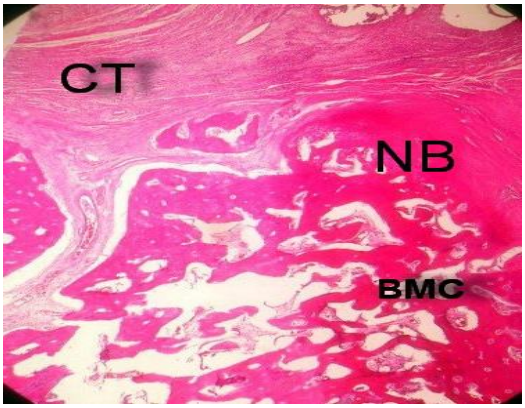
شکل ۳. گروه کنترل روز صفر: تشکیل بافت همبند (CT) و همچنین تشکیل بافت غضروف قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰X).



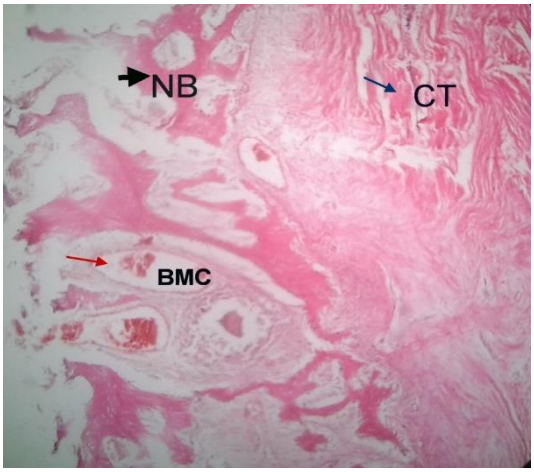
شکل ۵. گروه کنترل روز سی‌ام:تشکیل بافت همبند (CT) تشکیل بافت غضروف (C) و همچنین تشکیل بافت استخوانی به میزان کم (NB) مشاهده حفرات مغز استخوان (BMC)) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰X)



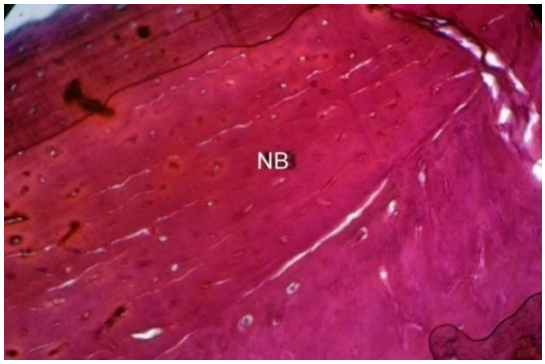
شکل ٤. گروه درمان روز صفر: بافت غضروف (C) و بافت همبند (CT) تشکیل شده است .همچنین بافت استخوانی جدید (NB) و حفرات مغز استخوان (BMC) نیز قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰X).



شکل ٦. گروه تحت درمان روز سی‌ام: استخوان جدید ساخته‌شده (NB) قابل مشاهده است. بافت فیبروز به نسبت تشکیل شده است (CT) و حفرات مغز استخوان نیز وجود دارد (BMC) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰X).



شکل ۷. گروه کنترل روز شصت: استخوان‌سازی به میزان بسیار کم مشاهده شده (NB)، بافت فیبروز تشکیل‌شده (CT) و حفرات مغز استخوان نیز قابل مشاهده است (BMC) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰ X).



شکل ۸. گروه درمان روز شصت: بافت استخوانی جدید به شکل متراکم تشکیل شده است (NB) (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین ۱۰۰ X)

بحث و نتیجه‌گیری

شکستگی‌های استخوانی و یا سیستم اسکلتی بدن در تمام موجودات زنده یکی از مهمترین مشکلات میباشد به این خاطر که التیام استخوان به‌دلیل سختی این بافت بسیار طولانی‌مدت بوده و ممکن است عوارض جانبی فراوانی را در عضو درگیر ایجاد نماید. نه تنها عضو درگیر مورد بحث بوده بلکه می‌تواند با اختلال در ارگان‌های دیگر نظیر سیستم گوارش منجر به کاهش وزن بر اثر بی‌اشتهایی و در نهایت کاهش راندمان تولید در حیواناتی که از لحاظ اقتصادی مهم می‌باشند، شود. بیومتریال‌های متعددی در دست بررسی می‌باشد که قادر است در التیام این بافت مهم و ارزشمند کمک بسزایی نموده و در بهبودی اثر بخش باشند. لذا مطرح شدن انواع مواد سنتتیک و یا برگرفته شده از طبیعت که در زیرساخت‌های آن می‌توان راهی در جهت ترمیم این بافت مهم پیدا نمود بسیار ارزشمند بوده و قابل کاربرد می‌باشد (Nohebert, 2005).

طبق بررسی‌های انجام‌شده در این مطالعه هدفی که مد نظر می‌باشد، ارزیابی میزان تأثیر بیومتریال‌ها بوده که در واقع نوعی مواد زیست‌سازگار با بدن موجود زنده می‌باشند و از لحاظ میزان واکنش‌های بافتی تأثیرات بسیار ناچیزی در گردآوری سلول‌های التهابی در ناحیه تحت درمان داشته و هدف دیگر در این بررسی ارزیابی میزان تحریک سلول‌های استخوان‌ساز به‌واسطه حضور بیومتریال مورد نظر می‌باشد به‌طوری‌که Ghorbanzadeh *et al.* (2014) نشان داده‌اند که میزان تأثیرپذیری غشای داخلی تخم‌مرغ نژاد لگهورن بر روی بافت همبند از لحاظ پاسخ ایمنی بسیار ناچیز بوده و می‌توان از این مادهی طبیعی به عنوان یک عنصر زیست‌سازگار با بدن موجودات زنده استفاده نمود. البته قابل ذکر است که در بررسی‌های انجام شده توسط Losso *et al.* (2000) خاصیت ضد باکتریایی این ماده مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج مطالعه آنها حاکی از اثر مهار رشد باکتری‌هایی نظیر لیستریا و لاکتوباسیلوس بود.

در مطالعه‌ای که توسط Arias *et al.* (2008) انجام گرفت، نشان دادند که غشای داخلی تخم‌مرغ قادر است با ممانعت از رشد بیش از حد کال استخوانی شرایط را برای کاهش رشد استخوان اضافه ایجاد نموده و در ریخت‌شناسی استخوان مؤثر باشد. Kanczler & Oreffo (2008) نیز بیان کردند که منبع سلول‌های استخوان‌ساز از ناحیه پرده ضریع و آندوستیوم و مغز استخوان است که بدون تحریک می‌تواند استخوان تولید کند.

در مطالعه‌ای دیگر Brandon *et al.* (2010)

نشان دادند اختلال در التیام شکستگی موقعی اتفاق می‌افتد که اختلال در خون‌رسانی ایجاد شود و یا این که تغییرات نکروزی در بافت استخوان و بافت‌های اطراف ایجاد شود.

Aghazadeh *et al*. (2010) به بررسی اثر ماتریکس استخوان دمینرالیزه گاو بر ترمیم نقایص استخوان پاریتال خرگوش پرداختند که نتایج این تحقیق حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و گروه استفاده‌شده از ماتریکس استخوان بود.

طی تحقیقی به ارزیابی هیستوپاتولوژیک تأثیر مصرف پودر خوراکی مرجان خلیج فارس در روند ترمیم ضایعات استخوان پرداخته شد که نتایج مطالعات آنها بیانگر اثرات مفید مرجان به‌عنوان یک بیومتریال اوستئوکونداکتیو و داربست استخوانی برای التیام نقص درشت‌نی از طریق افزایش استخوان‌سازی در ناحیه مورد نظر بود که نتایج مطالعه ما با این تحقیق همخوانی دارد (Marjani *et al*., 2013).

در پایان باید گفت که استفاده از بیومتریال‌ها می‌تواند در کاهش سلول‌های التهابی و افزایش میزان تراکم استخوانی مؤثر باشد به‌دلیل آن که ما یک اختلاف معنی‌داری را در میزان استخوان‌سازی در روزهای صفر و ۳۰ و ۶۰ بعد از جایگزینی بیومتریال در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود که میزان تراکم استخوانی و استخوان‌سازی در گروه تیمار به‌شدت افزایش پیدا کرده است و سطح آن نیز بالاتر از گروه کنترل است. میزان سلول‌های التهابی نیز در گروه تیمار در روزهای مختلف بعد از جایگزینی بیومتریال به‌شدت کاهش یافته است، پس می‌توان از بیومتریال‌ها در ترمیم هرچه سریع‌تر شکستگی‌های استخوانی و آسیب‌های واردشده به استخوان استفاده کرد.

لذا با نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه برروی استخوان درشت‌نی ۸ قلاده سگ و بررسی‌هایی نظیر تراکم‌سنجی بافت استخوان درشت‌نی و همچنین مطالعات انجام‌شده در تحقیقات پیشین نظیر حضور پروتئین‌های شبیه به کلاژن و همچنین تحریک فیبروبلاست توسط غشای داخلی تخم‌مرغ و خاصیت جذب و انتقال یون کلسیم توسط این ماده در غشای روده باریک و مهیا نمودن شرایط برای رشد بافتی، این نتیجه حاصل می‌شود که این بیومتریال قادر خواهد بود، التیام مد نظر را در طول دوره تعیین‌شده ایجاد نموده و نتایج رضایت‌بخشی را ارائه نماید. این بیومتریال میتواند به‌عنوان جایگزین استخوان در صنعت بیوکامپوزیت‌ها مطرح گردیده و در آینده بسیار مفید واقع شود.

REFERNCES

Aghazadeh, S.; Azimi Leysar.; H.R.; (2010). The Effect of Bovine Demineralized Bone Matrix on Regeneration of Rabbit Parietal Bone Defects. Journal of Dental Medicine; 23(2): 86-94.

Arias, J.I.; (2008). Eggshell Membrane as a Biodegradable Bone Regeneration Inhibitor, Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine; 2(4): 228-235.

Bax, B.E.; Wozney, J.M.; Ashhurst, D.E.; (1999). Bone morphogenetic protein-2 Increases The Rat Callus Formation After Fracture of The Rabbit Tibia. Calcify Tissue. Int. 65:83-89.

Brandon Beamer, B.A.; (2010). Vascular Endothelial Growd Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. HSSJ; 6: 85-940.

Ercan, D.; (2007). Evaluation of the Biocompatibility and Osteoproductive Activity of Ostrich Eggshell Powder In Experimentally Inducedcalvarial Defects In Rabbits, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials; 86(1): 82-89.

Ghorbanzadeh, P.Sh.; (2014). Reaction of the Subcutaneous Connective Tissue to Locally Injected Egg Shell and Egg shell membrane In Animal Model. Sylwan J.; 158(7): 220-234.

Kanczler, J.M.; Oreffo, R.O.C.; (2008). Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential for Engineering Bon. European Cells and Materials; 15: 100-114.

Kumar, A.; Fausto, M.; (2009).Robbins Basic Pathology .8th ed.; 88-91.

Laughlin, R. M.; Scott, H.W.; (2003). Feline Orthopedic. pp: 514-518.

Losso, JN.; Nakai, S.; Charter, EA.; (2000). Lysozyme. In: Natural Food Antimicrobial Systems (Naidu AS ed.). pp. 185_210. CRC Press, Inc. NewYork.

Marjani, M.; Faghihi, H.; (2013). Histopathologic Evaluation of The Persian Gulf Coral Powder Effect on Bone Defect. Journal of Jahrom University of Medical Science, 11(2): 15-22.

Nohebaert, M.; (2005). Omental Angiogenic Lipid Fraction and Bone Repair. An Experimental Study In The Rat. Journal of Ortho Research; 7(2): 157-169.

Theresa, WF.; (2007). Small Animal Surgery. 3rd Edition, Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, College Station, Texas.