

Tavşanlarda uzun kemiklerdeki geniş segmental defektlerin iyileşmesinin allojenik demineralize kemik matriksi ve otojen kemik iliği transplantasyonu ile uyarılması

Ahmet Kırıl⁽¹⁾, Ömer Şarlak⁽²⁾, Ethem Gür⁽²⁾, Nuri Gültekin⁽³⁾

Çalışmamız geniş femur diafiz defektlerinin tedavisinde allojenik demineralize kemik matriksi (DBM) ve otojen kemik iliği trdantasyonunun etkisini saptamak amacıyla, GATA araştırma merkezinde, tavşanlar üzerinde gerçekleştirildi. İlk önce iyileşmeyecek ve non-unionla sonuçlanacak bir standart segmental defekt oluşturma yöntemi geliştirildi. Daha sonra ise oluşturulan bu defektlere bir grupta sadece allojenik DBM, bir başka grupta ise allojenik DBM ile birlikte otojen kemik iliği transplantasyonu yapıldı. Tüm gruplarda 13 hafta süre ile iyileşme, klinik radyolojik ve histolojik olarak takip edildi. Union insidansı sadece allojenik DBM implante edilen grupta % 73, hem allojenik DBM ve hemde otojen kemik iliği implante edilen grupta ise % 100 idi. Ayrıca radyolojik olarak kemik dokunun ilk kez görülmesine kadar ve union oluşmasına kadar geçen minimum süreler son grupta daha kısa idi. Böylece sonuç olarak, her iki yöntemde geniş femoral diafiz defektlerinin tamirinde değerli olduğu ayrıca allojenik DBM ile birlikte otojen kemik iliği transplantasyonu yönteminin, sadece ollajenik DBM implantasyonu yönteminden daha etkin olduğu saptar dı.

Anahtar kelimeler: Demineralize kemik matriksi, geniş segmental kemik defektleri.

Induction of healing of large segmental defects of long bones in rabbits wiht transplantation of allogenic demineralized bone matrix (DBM) and autogenous bone marrow

We studied the effects of allogenic demineralized bone matrix (DBM) and autogenous bone marrow on the repair of large femoral diaphyseal defects in a rabbit model, in GATA Research Ceutre. A standart procedure was first developed to create segmental defects that did not heal and in which non-union developed consistently. Allogenic DBM alone was then transplanted into these defects in one group and both allogenic DBM and autogenous bone marraw were in the other. Healing was followed clinically, radiologically and histologically for 13 weeks in all groups. Incidence of union was 73 % in allogenic DBM implanted group alone and was 100 % in both allogenic DBM and autogenous bone marrow implanted group. Minimum time to see roentgenographically visible bone and minimum time to produce union were also shorter in the latter one. We conclude that both methods are valuable in repair of large femoral diaphyseal defects and that allogenic DBM and autogenous bone marrow transplantation method is more effective than allogenic DBM implantation method alone.

Key words : Demineralized bone matrix, large segmental bone defects.

Kırık kaynama devreleri içinde kırık kaynaması açısından en önemlisi; fibröz, kıkırdak ve kemiksel elemanlardan oluşan kal dokusu yapımı ile karakterize olan tamir devresidir. Kal dokusu yapımında görev alan hücreler "pluripotent embriyonal mezenkimal hücreler" den köken alır. Adalede, faciada, periostta, endotel veya perivasküler alanda, kemik iliğinde ve dolaşımda bulunan bu embriyonal hücreler çeşitli uyanların etkisi ile hücrenel farklılaşmaya uğrar ve fibröz doku, kıkırdak doku veya kemik dokuyu oluşturacak öncü hücrelere dönüşürler (1,2,13,15).

Kırık olur olmaz, gelen bir emir üzerine pluripotent embriyonal mezenkimal hücreler kal dokusunu oluşturacak fibroblast ve osteoblastlara dönüşmektedir. Bu bilgiler ve emirler bu hücrelere nasıl ve kim tarafından iletilmektedir?

Hulth 1980 yılında kırık iyileşmesi ile ilgili yeni bir teori ileri sürmüştür(8). Bu otöre göre bir kırık olayında tahrip olan kemik dokusu ve çevre yumuşak dokulardan ortaya çıkan bir takım moleküller gerekli bilgileri çevredeki pluripotent embriyonal mezenkimal hücrelere taşımak-

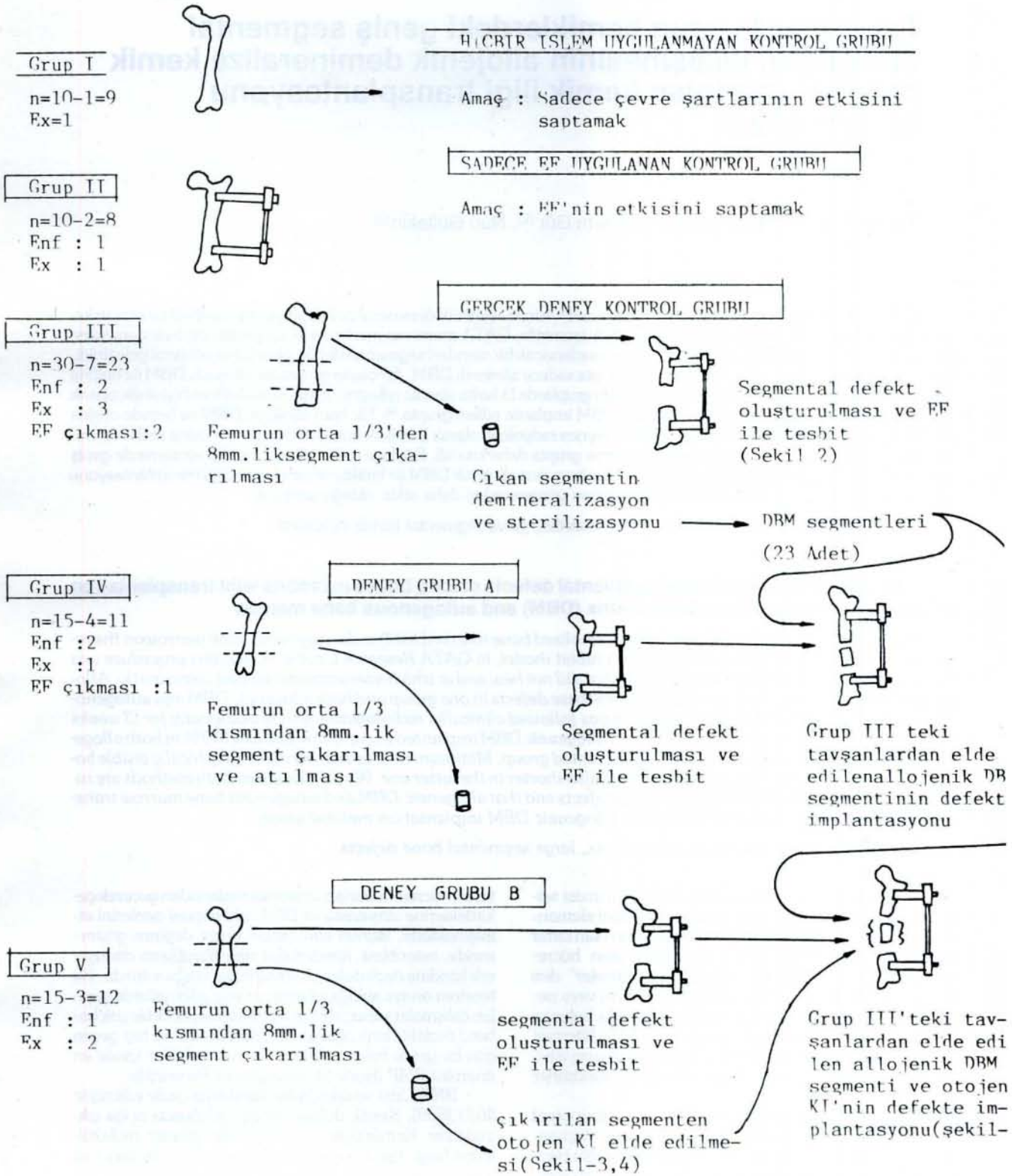
ta, bu hücrelerin zarları ve stoplazmalarından geçerek çekirdeklerine ulaşmakta ve DNA'daki yapısal genlerini etkilemektedir. Bunun sonucunda hücre değişim göstermekte, osteoblast, kondroblast veya fibroblastta dönüşerek kendine özgü dokuyu oluşturmaya başlamaktadır. Bu teorinin ortaya atıldığı yıllarda ve takip eden yıllarda yapılan çalışmalar sonucu bu teoriyi destekleyecek bir çok haberci molekül kırık olgularında saptanmıştır ve her geçen gün bir yenisi bulunmaktadır. Bu molmeküller içinde en önemlisi BMP (Bone Morphogenetic Protein)dir.

BMP Urist ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (16,17,18,19). Kemik dokusu tahrip olduğunda açığa çıkmaktadır. Kemik dokusu matriksinde kollagen moleküllerine bağlı, fakat ondan farklı bir proteindir. Kollagenaz enzimine rezistandır. Bu protein kemik matriksinin yanısıra diş dokusunun matriksindedeyer almaktadır. Pluripotent embriyonal mezenkimal hücreleri etkileyerek osteoprogenitor hücreler haline dönüşmelerine neden olur. Kemik matriksi demineralize edildiğinde bu proteinin aktivitesi artmaktadır(4,7). Bunun nedeni mineralize bir kemik dokusu içinde proteinin diffüzyibilitesinin az ol-

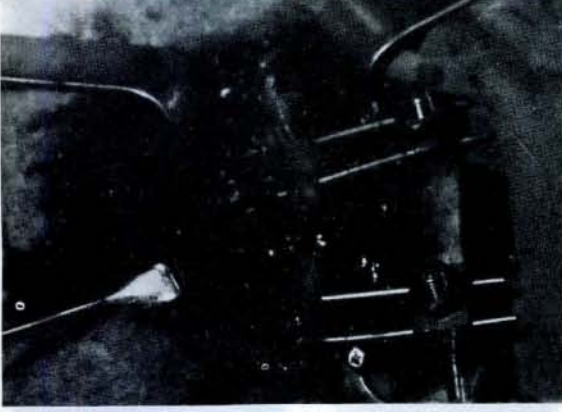
(1) GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Ortopedi Kliniği uzmanı

(2) GATA Ortopedi ve Traumatoloji A.B.D. Öğretim Üyesi. Prof. Dr.

(3) GATA ortopedi ve Traumatoloji A.B.D. Öğretim Üyesi. Doç. Dr.



Sekil - 1. Deneysel grupları (n= Deneysel dahil edilen denek sayısı= Başlangıç denek sayısı - deneysel komplikasyon nedeniyle çıkarılan denek sayısı, EF = External fixatör, DBM = Demineralize kemik matrisi, Enf = Enfeksiyon, Ex = Exitus, Ef çıkması = External fixatör çıkması, KI = Kemik iliği)



Resim-1: Femur orta 1/3 kısmında 8 mm.lik segmental defekt oluşturulması ve external fiksator ile tesbit.

ması, demineralize kemik dokusu içinde ise daha rahat hareket edebilmesidir. Bu gün bu protein birçok canlı türünde izole edilmiş durumdadır(5,7,13). Genellikle düşük molekül ağırlıklı olan bu proteinler türe özgüdür:

- Sığır BMP'si : 17.000-18.000 Dalton
- Pare osteosarkoma ve tavşan dentin BMP'si : 3.000 Dalton.
- İnsan BMP'si (iki fraksiyondur):
 - 1. fraksiyon: 14.000 Dalton
 - 2. fraksiyon: 24.000 Dalton.

BMP'den zengin olan demineralize edilmiş kemik matriksi (DBM) adale içine implante edilirse, koyulduğu yerdeki pluripotent embriyonal mezankimel hücrelerde mitoz başlar. Bu hücreler osteoprogenitor hücrelere dönüşerek o bölgede kemik dokusu oluşur(5,7,11,13,19).

BMP'nin etkili bir uyarı yaratabilmesi için yakın çevresinde pluripotent embriyonal mezankimel hücrelerin olması ve ayrıca ortamın geçirgen olması gerekmektedir.(4,6,7,12,16) Çalışmamızın amaçları şöyle özetlenebilir:

1- Tavşanlarda uzun kemiklerde tedavi edilmezse non-unionla sonuçlanacak segmental diafizyal bir defekt sistemi oluşturmak. Normalde tavşanlarda kırıklar o kadar kolay ve süratli kaynarkı, kırık iyileşmesini önlemek ve non-union oluşturmak oldukça zordur. Son yıllarda Segal ve arkadaşları tarafından sıçanlarda uzun kemiklerde non-union oluşturan bir teknik geliştirilmiştir. Bu tek-

nikte femurun orta bölümünde rezeke edilerek oluşturulan defektin uzunluğunu muhafaza edebilmek için, defekte omega () şeklinde, uçları femurun medullasına giren bir pin yerleştirilir, alçı yapılmaz. Ancak bu pin defektin kapanmasını önlerken aynı zamanda medüller kanal ağzını tıkamaktadır. Bu nedenle bu mahsuru ortadan kaldıracak yeni bir sistem geliştirmek gerekmektedir(14).

2- Oluşturulacak defekte demineralize kemik matriksi implante ederek kaynamayı sağlamak.

3- Oluşturulacak defekte demineralize kemik matriksi ile birlikte otojen kemik iliği transplante ederek kaynamayı sağlamak.

4- Kemik defekte oluşması beklenen kal dokusunun gelişimini klinik, radyolojik ve histolojik olarak inceleyerek deney grupları ile kontrol grupları arasında kaynama yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını saptamak.

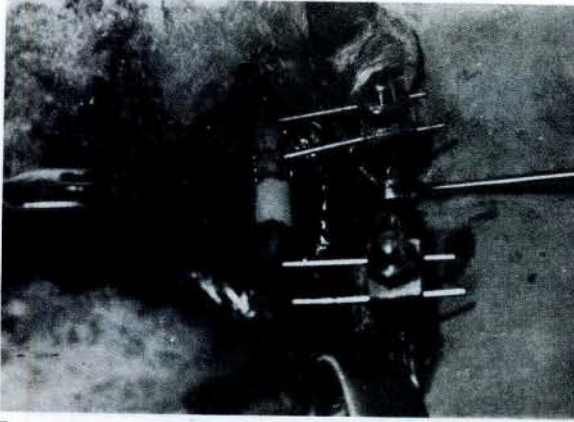
Gereç ve Yöntem

Araştırmamız için GATA Araştırma Merkezinden sağlanan, Veteriner kontrolünden geçmiş, bir yaşında ve ortalama ağırlıkları 2,5 kg olan 80 adet sıhhatli erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar deney öncesi 24 saat süreyle laboratuvar şartlarında tutuldu, deney sonrasında aynı çevrede muhafaza edildi. Ameliyat edilecek olan hayvanlar operasyon öncesi alt: saat süre ile aç bırakıldılar. Tavşanları uyutmak için anestezi madde olarak Ketalar (Ketamin Hidroklorid) 10 mg/kg dozda I.M. olarak kullanıldı. Ketalar enjeksiyonundan 5 dakika sonra ise adale gevşetici olarak Rompun (Xylazir: Hidroklorid) 10 mg/kg dozda I.M. olarak yapıldı. Bu iki ilaç ile bir saat kadar anestezi sağlandı. Ortalama ameliyat süremiz ise yarım saat idi. Anesteziden sonra hayvanların ameliyat sahaları tıraş edildi, ameliyat masasına alınarak Betadine solüsyonu ile yıkandı ve steril örtülerle örtüldü. Ameliyatlarda Ana Bilim Dalımızdaki ortopedik el cerrahi aletleri ve tarafımızdan tasarlanıp GATA Suni Aza Atölyesinde yaptırılan mini eksternal fiksatorler kullanıldı (Resim 1).

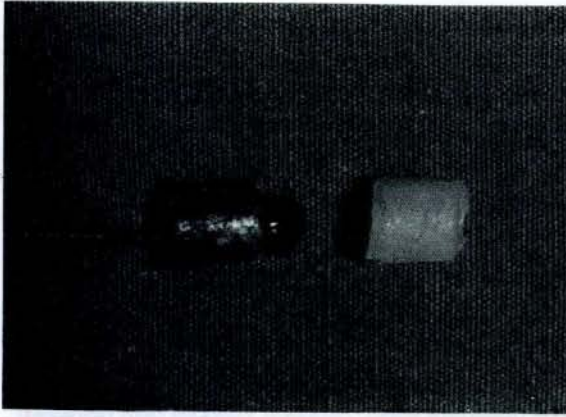
Tüm ameliyatlarda hayvanların sağ femurunda yapıldı. Femura 4 cm. uzunluğunda anterolateral insizyon yapılarak girildi.

Deney gruplarında yapılan işlemler ve her grupta çıkan komplikasyonlar Şekil 1'de gösterilmektedir.

DBM elde edilmesinde dikkat edilecek en önemli nokta kemiğin osteoindüksiyon aktivitesini ortadan kaldırmadan demineralizasyon ve sterilizasyonu gerçekleştirmektir(3,7,10,16,17). Biz kendi araştırmamızda Einhorn ve arkadaşlarıncı (4) geliştirilen demineralizasyon ve sterilizasyon yöntemini kullandık. (Şekil 2).

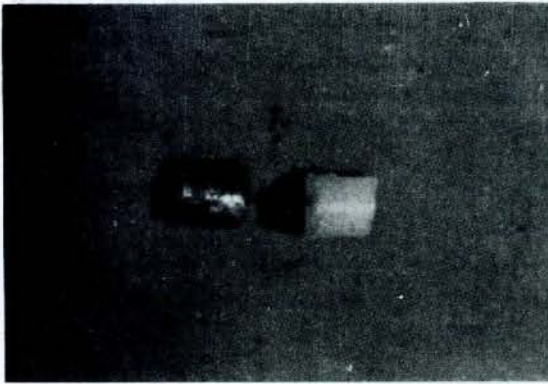


Resim-2: Rezeke edilen segmentin kemik iliğinin çıkarılması.



Resim-3: Çıkarılan kemik iliğinin demineralize edilmiş kemik matriksi segmentinin medullasına doldurulması

Otojen kemik iliği transplantasyonu için Tagaki ve Urist (I4) ile Lindholm ve Nilsson'un (II) kullandığı yöntem uygulandı. (Resim 2 ve 3,4)

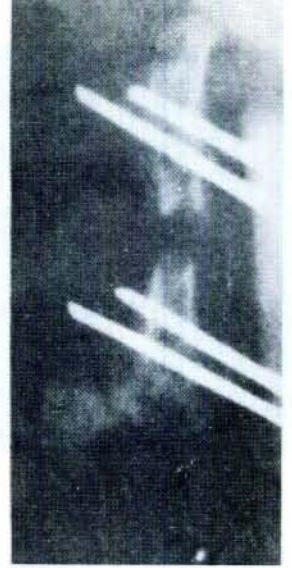


Resim-4: Medullası otojen kemik iliği ile doldurulmuş allojenik demineralize kemik matriksinin defekt yerine implantasyonu.

Ameliyat bitince tavşanların radyografileri çekildi ve sürekli kalacakları kafeslerine götürüldü. Hayvanlara alçı uygulanmadı. Birkaç gün içinde ameliyat edilen bacakları üzerine basarak external fiksatörleri ile kafes içinde dolaşmaya başladılar. Hayvanlar üç ay süreyle takip edildi. İki haftalık aralarla radyografi kontrolü yapıldı. On üçün-



A



B



C



D

Resim 5: Grup V'te yer alan ve allojenik demineralize kemik matriksi ile birlikte otojen kemik iliği transplantasyonu yaptığımız bir olgunun takip grafileri.

A. Ameliyattan hemen sonra

B. 2 hafta sonra

C. 6 hafta sonra

D. 12 hafta sonra

cü hafta sonunda III, IV ve V. gruptaki hayvanlar öldürülerek kal dokusunun oluşumunun hangi safhada olduğu gross ve histolojik olarak incelendi.

Deney grupları	Tavşan sayısı	Yapılan İşlem	Nonunion insidansı	Union insidansı	Radyolojik olarak kal dokusunun ilk görülme zamanı(Hafta olarak)	Union olması için geçen minimum süre (Hafta olarak)
III	23	Segmental defekt oluşturması	23	-	-	-
IV	11	Segmental defekt oluşturulması ve defekte allojenik DBM implantasyonu	3	8	3	8
V	12	Segmental defekt oluşturulması ve defekte allojenik DBM ile birlikte otojen KI transplantasyonu	-	12	2	6

Tablo-1: Tavşanlarda femur segmental diafiz defektlerinin tedavisinde uygulanan lokal cerrahi tedavi yöntemlerinin klinik, radyolojik ve histolojik sonuçları.
DBM : Demineralize kemik matriksi
KI : Kemik iliği

Bulgular

Yaptığımız araştırmanın sonuçları tablo I de görülmektedir. 13 haftalık takip süresi sonunda, klinik, radyolojik ve histolojik olarak Grup III'deki tavşanların hiçbirinde union oluşmadığı saptanmışken, Grup IV'deki tavşanlarda 11 olgudan 8'inde, Grup V'deki tavşanlarda ise 12 olgunun tümünde union gelişmiştir. (Resim 5)

Uygulanan tedavi yöntemlerinin sonuçlarını istatistiksel olarak değerlendirmek amacıyla gruplar arasında "Yates" düzeltmesi yapılarak "Fischer ki-kare (chi-square) exact testi" uygulanmıştır. Bu test ile grup III ile grup IV, grup III ile grup V ve grup karşılaştırıldığında hepsinde p değerleri ($p < 0,05$) anlamlı bulunmuştur.

Radyolojik olarak kal dokusunun küçük adacıklar halinde görülmesi grup IV'te üçüncü haftada, grup V'te ise ikinci haftada başlamıştır.

Radyolojik ve klinik union oluşması için geçen minimum süre ise IV. grupta 8 hafta, V. grupta ise 6 hafta olarak bulunmuştur.

13. hafta sonunda III., IV. ve V. gruplardaki tüm tavşanlar öldürülerek incelendiğinde, III. grupta tüm olgularda defekt yerinde grossve histolojik olarak hiç kal dokusu bulunmadığı, IV. grupta radyolojik ve klinik olarak nonunion saptanan 3 olguda ise histolojik olarak fibröz ve kırık dokü elementlerinden ve yer yerde çok az miktarda mineralize olmamış osteoid dokudan oluşan yumuşak bir kal dokusu bulunduğu saptanmıştır. Grup IV'teki diğer 8 olgu ve grup V'teki tüm olgularda remodelizasyon devresinde olduğu, diğer beşinde ise tamir devresinin özelliği olan düzensiz kemik trabeküllerinin fazla olduğu görülmüştür.

Tartışma ve Sonuç

Daha önce belirtildiği gibi tavşan, siçan ve farelerde uzun kemiklerde kırıklar çok kolay ve süratli kaynar ve bu hayvanlarda deneysel amaçla nonunionla sonuçlanacak segmental diafizyal bir defekt sistemi oluşturmak oldukça zordur. Segal ve arkadaşları tarafından geliştirilen omega () pin ile nonunion oluşturma yönteminin, medüller kanalları tıkayarak, kırık kaynamasında büyük rolü olan kemik iliği kökenli hücrelerin kırık bölgesine gelmesini engelleme mahsuru vardır(14). Bizim kendi geliştirdiğimiz

eksternal fiksator ile nonunion oluşturma yöntemimiz ise bu mahsuru ortadan kaldırmaktadır. Yaptığımız çalışmada grup III'teki tüm hayvanlarda defekte kaynama olmaması ve nonunion gelişmesi yöntemimizin etkinliğini göstermektedir. Bu yöntem ilerde tavşanlarda yapılabilecek uzun kemiklerin segmental defektleriyle ilgili çalışmalarda nonunion oluşturmak amacıyla başarıyla uygulanabilecek bir deneysel modeldir.

Gene yaptığımız çalışmada, deney grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeler göstermektedirki tavşan uzun kemiklerinde oluşturulan segmental diafizyal kemik defektlerinin tedavisinde hem demineralize kemik matriksi implante edilmesi yöntemi, hemde demineralize kemik matriksiyle birlikte otojen kemik iliği transplantasyonu yöntemi union oluşturma bakımından değerli yöntemlerdir. Ancak bu iki yöntem birbirini karşılaştırıldığında da p değerinin anlamlı bulunması ($p < 0,05$) demineralize kemik matriksi ile birlikte otojen kemik iliği transplantasyonu yönteminin union oluşturmada daha etkin olduğunu göstermektedir. Ayrıca radyolojik olarak kal dokusunun IV. grupta üçüncü haftada, V. grupta ise ikinci haftada görülmeye başlaması; radyolojik ve klinik unionun IV. grupta sekiz haftada, V. grupta ise altıncı haftada oluşması ve histolojik incelemede V. gruptaki olgularda kırık kaynamasının daha ileri bir devrede olması, oluşturulan defekte demineralize kemik matriksi koyulmasına ilaveten otojen kemik iliği transplantasyonu yapılmasının kırık kaynamasını aynı zamanda çabuklaştırdığını göstermektedir.

Demineralize kemik matriksi daha önce belirtildiği gibi implante edildiği bölgede ve bu bölgenin çevresinde bulunan Pluripotent embriyonal mezenkimal hücreleri uyarak bu hücrelerin osteoprogenitor hücrelere dönüşmesine ve kemik yapımının başlamasına neden olmaktadır. Eğer otojen kemik iliği transplante edilerek çevredeki pluripotent embriyonal mezenkimal hücrelerin yoğunluğu artırılırsa "osteoinductive" etki dahada artmaktadır. Bu güne kadar hayvanlarda cranium defektleri ve medial kondil defektlerinin, insanlarda ise periodontal defektlerin, soliter unicameral kemik kistlerinin, maxilla ve mandibula defektlerinin ve kranial defektlerin tamirinde allojenik demineralize kemik matriksi yalnız başına ve-

Otojen kemik iliği ile birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır(4,7,9,11). Bizim çalışmamızın sonuçlarında allojenik demineralize kemik matriksi ve otojen kemik iliğinin bu "osteoinductive" etkilerini teyid etmekte ve ayrıca şimdiye kadar yapılmış çalışmalardan farklı olarak bu yöntemin hayvanlarda ağırlık taşıyan uzun kemiklerin segmental diafiz defektlerinin tedavisinde de başarı ile uygulanabileceğini göstermektedir.

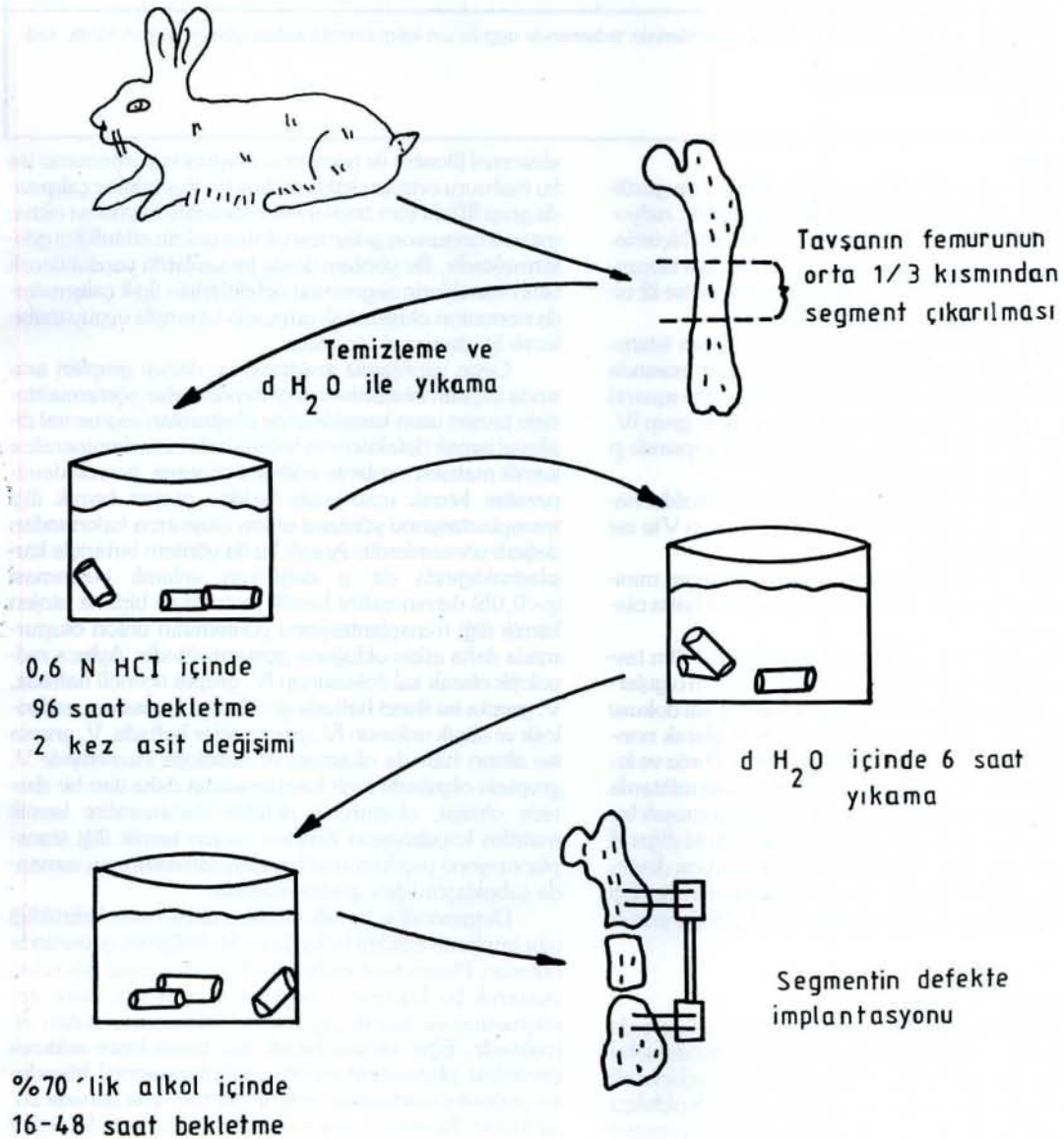
İnsanlarda uzun kemiklerin diafizlerinde çeşitli nedenlerle oluşan geniş defektler günümüzde halen ortopedinin en büyük sorunlarından birisidir. Bu güne kadar bu defektlerin tamirinde otojen greftler, homolog greftler (allogreftler), heterolog greftler (xenogreftler) ve çeşitli inorganik materyaller kullanılmıştır(4,7,13,14).

Otojen greftler halen başarı ile kullanılmasına rağmen bunun yerini alabilecek yeni bir materyale ihtiyaç vardır. Bu materyal kolayca sterilize edilebilmeli, kolay

şekil verilebilmeli, yeterli miktarlarda elde bulunabilmeli ve oda sıcaklığında muhafaza edilebilmelidir. Böylece ameliyat süreleri kısalmayacak, greft elde etmek için fazladan bir ameliyata gerek kalmıyacak ve enfeksiyon riski azalacaktır. Krista iliakadan greft alınması basit bir işlem olarak görülmemelidir. Çoğu zaman greft alınan yer esas ameliyat edilen yerden çok daha fazla rahatsızlık vermektedir(12).

Allojenik banka greftleri halen kullanılmasına rağmen kırık, rezorpsiyon, nonunion gibi komplikasyonları vardır(7). Allogreftler antijenik özellikleri nedeniyle iltihabi reaksiyon oluştururlar. Dondurma ve liofilizasyon işlemleri bu greftlerin antijenik özelliklerini azaltmasına rağmen tamamı ile yok etmez(7,12). Greft etrafında gelişen iltihabi reaksiyon ise vaskülarizasyon hızını ve dolayısıyla yeni kemik oluşum hızını azaltır(12).

Xenogreftler ise antijenik özelliklerinin allogreftler-



Sekil-2

Kemik matrikslerinin demineralizasyon ve sterilizasyonu

dende fazla olması nedeniyle alıcı tarafından iyi tolere edilmezler ve yeterli osteojenik uyarım sağlamazlar (4,7).

Sonuç olarak söylenebilirki allojenik demineralize kemik matriksi kolayca sterilize edilebilmesi, kolay şekil verilebilmesi, antijenik reaksiyona yol açmaması, ameliyat süresini kısaltması, bol miktarda elde bulundurulabilmesi ve oda sıcaklığında saklanabilmesi gibi özellikleri nedeniyle tüm greftlerin ve materyallerin yerini tutabilecek bir madde dir.

Hayvan deneylerinin sonuçlarını direkt olarak insanlar üzerinde uygulamak mümkün değildir. Allojenik demineralize kemik matriksi transplantlarının ortopedik cerrahide kullanılabilirliğini saptamak için insanlar üzerinde çok iyi kontrollü hazırlanmış deneyler yapılması gerekmektedir. Ancak son yıllarda yapılan birçok araştırmalar ve bizim yaptığımız araştırmanın sonuçları, demineralize kemik matriksi transplantlarının allojenik banka greftlerinden çok daha başarılı sonuçlar vereceği izlenimini bırakmaktadır.

Kaynaklar

- 1- Chalmers, J. and Gray, D.H.: Observations on the Induction of Bone in Soft Tissues. *J. Bone Joint Surg.*, 57 B:36, 1975.
- 2- Cruess, R.L. and Dumont, J.: Healing of Bone, Tendon and Ligament. Rockwood, C.A. and Green, D.P., Eds: *Fractures*, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1984, 147-167.
- 3- Dubuc, F.L. and Urist, M.R.: The Accessibility of the Bone Induction Principle in Surface-Decalcified Bone Implants. *Clin. Orthop.* 55:217, 1967.
- 4- Einhorn, T.A. and Lane, J.M.: The Healing of Segmental Bone Defects Induced by Demineralized Bone Matrix. *J. Bone and Joint Surg.*, 66 A:274-279, 1984.

5- Everts, C.M.: *Surgery of The Musculoskeletal System*, Vol I, New York, Edinburg, London, and Melbourne, Churchill Livingstone, 1983, 1:65-87.

6- Hanamura, H., Higuchi, Y. and Nakagawa, M.: Solubilized Bone Morphogenetic Protein (BMP) from Mouse Osteosarcoma and Rat Demineralized Bone Matrix. *Clin. Orthop. Scand.* 148:281, 1980.

7- Harakas, N.K.: Demineralized Bone Matrix Induced Osteogenesis. *Clin. Orthop.* 188:239, 1984.

8- Hulth, A.: Fracture Healing. A Concept of Competing Healing Factors. *Acta. Orthop. Scand.* 51:5-8, 1980.

9- Kaban, L.B. and Glowacki, J.: Induced Osteogenesis in the Repair of Experimental Mandibular Defects in Rats. *J. Dent. Res.* 60:1356, 1981.

10- Kramer, S.J. and Spadaro, J.A.: Antibacterial and Osteoinductive Properties of Demineralized Bone Matrix Treated with Silver. *Clin. Orthop.* 161:154, 1981.

11- Lindholm, T.S. and Nilsson, O.S.: Extraskelletal and Intraskelletal New Bone Formation Induced by Demineralized Bone Matrix Combined with Bone Marrow Cells. *Clin. Orthop.* 171:251, 1982.

12- Oikarinen, J.: Experimental Spinal Fusion with Decalcified Bone Matrix and Deep-frozen Allogeneic Bone in Rabbits. *Clin. Orthop.* 162:210, 1982.

13- Simmons, D.J.: Fracture Healing Perspectives. *Clin. Orthop.* 200:100, 1985.

14- Tagaki, K., and Urist, M.R.: The Role of Bone Marrow in BMP Induced of Femoral Massive Diaphyseal Defects. *Clin. Orthop.* 171:224, 1982.

15- Trueta, J.: The Role of Vessels in Osteogenesis. *J. Bone Joint Surg.*, 45 B:402, 1963.

16- Urist, M.R. and Silverman, B.F.: The Bone Induction Principle. *Clin. Orthop.* 53:243, 1967.

17- Urist, M.R.: Surface-Decalcified Allogeneic Bone Implants. *Clin. Orthop.* 56:37, 1968.

18- Urist, M.R. and Strates, B.S.: Bone Formation in Implants of Partially and Wholly Demineralized Bone Matrix. *Clin. Orthop.* 71:271, 1970.

19- Urist, M.R.: Bone Morphogenetic System in Residues of Bone Matrix in the Mouse. *Clin. Orthop.* 91:210, 1973.

Yazışma Adresi:

Dr. Ahmet Kiral

GATA Haydarpaşa Hastanesi

Ortopedi ve Travmatoloji Eğt. Uz. İSTANBUL