

VASKÜLARİZE PERİOST FLEBİNİN OSTEOJENİK KAPASİTESİNE OSTEOİNDÜKTİF VE OSTEOKONDÜKTİF AJANLARIN ETKİSİ (Ratlar Üzerinde Deneysel Çalışma)

Metin GÖRGÜ, Ali GÜRLEK, Bülent ERDOĞAN, Can KARACA,
Tayfun AKÖZ, Gürca ASLAN, Selda SEÇKİN

Numune Hastanesi 1. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği, Numune Hastanesi Patoloji Bölümü, Ankara, Turgut Özal Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Malatya, 9 Eylül Üniversitesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir.

ÖZET

Periost osteojeniktir ve transfer edildiğinde, yeni yerinde uygun koşullarda, yeni kemik oluşturmaktadır. Biz çalışmamızda ratların femoral periosteumunun yeni kemik oluşturmaya osteokondüktif ve osteoindüktif maddelerin etkilerini araştırdık. Rattların arka ekstremitelerinde hazırlanan vaskülarize periosoteal keselerin içine kansellöz kemik grefti, biyoaktif cam fiberi, tutoplast dura, pyrost, hidroksiapatit konuldu. Radyolojik, makroskopik ve histopatolojik değerlendirme üç ayın sonunda yapıldı. Boş periost keseler ile hidroksi apetit, kansellöz kemik ve pyrost içeren keselerde kemik oluşumu elde edilirken Tutoplast dura, biyoaktif cam fiberi içeren keselerde kemik elde edilemedi.
Anahtar Kelimeler: Osteoindüksiyon, Osteokondüksiyon, periosteal osteogenesis.

SUMMARY

The effect of osteoinductive and osteoconductive agents in the osteogenic capacity of vascularized periosteal flap. Periost has a osteogenic capacity and if transferred, periosteum produces new bone at the new site under suitable conditions. In this study we investigated effects of some materials on the periosteal bone formation of the rat femoral periosteum which are known as osteoinductive or osteoconductive. Vascularized periosteal sacs were prepared in the both hindlegs of the rats and cancellous bone graft, bioactive glass fibers, tutoplast dura, pyrost, hydroxyapatite were placed into the sacs. We present the radiologic, macroscopic and histopathologic results at 3 months. New bone was produced in empty sacs and in sacs filled with hydroxi apatite, cancellous bone and pyrost. Sacs filled with Tutoplast dura and bioactive glass fibers were failed to produce new bone.
Key Words: Osteoinduction, Osteoconduction, Periosteal osteogenesis.

Plastik cerrahi ve ortopedinin en önemli problemlerinden biri uzun kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu ve posttravmatik atrofik nonunionların iyileşmesinin sağlanmasıdır. Periostun osteojenik kapasitesi 1850'li yıllardan beri bilinmektedir. Plastik Cerrahide son on yıl içinde vaskülarize periostun osteojenik kapasitesini araştıran deneysel çalışmalar artmıştır. Periostun osteojenik kapasitesini transfer edildiği bir başka bölgede ve farklı ortamda sürdürmesi değişmektedir. periost başka bir alanda kemik yapımını sürdürmektedir, ancak oluşan kemiğin kalite ve kantite olarak yeterli olması için bazı şartlar gerekmektedir. Vaskülarizasyon, mekanik stres en önemli faktörlerdir. Çalışmanın amaçları: Osteojenik ve osteokondüktif

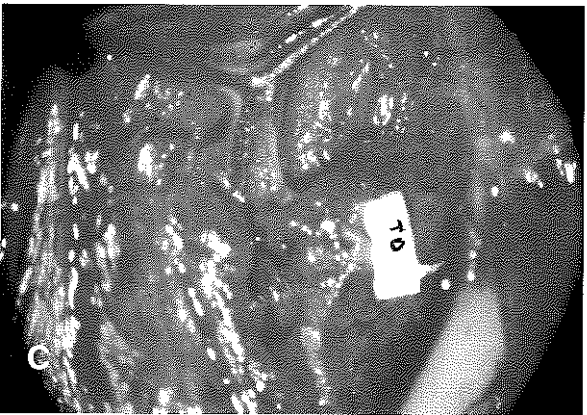
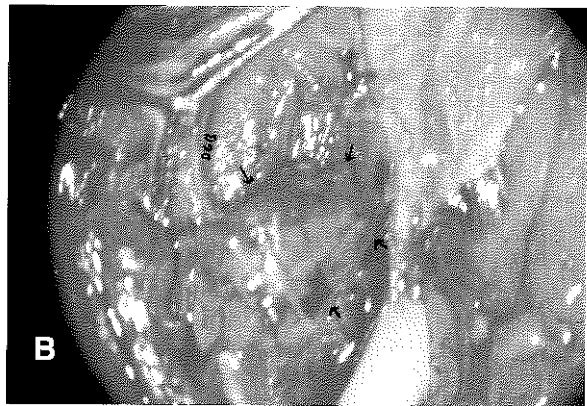
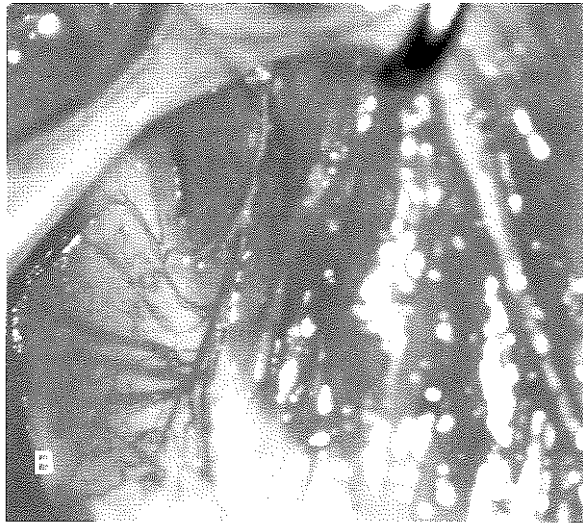
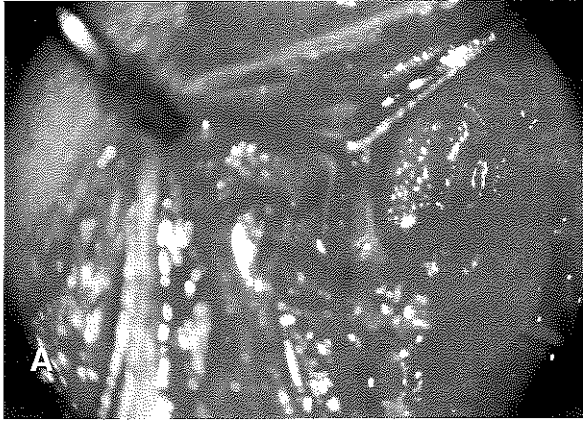
ajanlar ile hormonal stres faktörünün periostun osteojenik kapasitesi üzerine etkisini araştırmak.

GEREÇ, YÖNTEM ve BULGULAR

Planlanan deneysel çalışma H.Ü. Cerrahi Araştırma Laboratuvarında, ratlar üzerinde yapıldı. Sprague Dawley tipi yaklaşık 6 haftalık ve ortalama 200 gram ağırlıkta erkek ratlar kullanıldı. Çalışmada kullanılan model ratların arka ekstremitelerinde hazırlandı.

Anestezi: IM Ketamine 0.5cc/100g kullanıldı.

Operasyon: Anestezi sonrası ratlar operasyon panosu üzerine supine pozisyonunda tesbit edilip, her iki uyluk iç yüzünün tüyleri traş edildi ve operasyon alanının antisepsisi povidin iyot kullanılarak sağlandı.



Şekil 1a: Femoral arterden inen geniküler dalın ayrılışı (16 X) (Sağda inen geniküler arter addüktör magnus kasının üzerinde izlenmektedir) **b:** Alt 1/3 femur shaftı üzerindeki periostun inen geniküler arterin dallarınca kanlanması izlenmektedir (16 X)

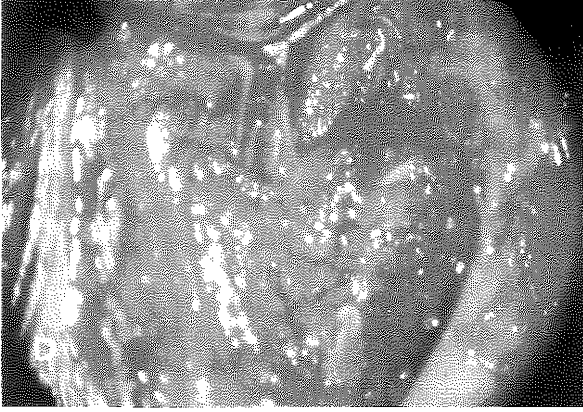
Operasyon mikroskopunda (OpMi 99 (Zeiss)) cilt, ciltaltı insizyonları ve femoral arterin serbestleştirilmesi 6 büyültmede, femoral arterin dalarnın diseksiyonu ve inen geniküler arterin addüktör magnus kası üzerindeki diseksiyonu 10 büyültmede ve periostun diseksiyonu, hızlanması, cep haline getirilmesi ve maddelerin konulması 16 büyültmede yapıldı.

Teknik: 1/3 distal femur bölgesinde yapılan femura paralel bir insizyonla cilt, ciltaltı geçilip femoral arter kenarından vastus medialis ile rektus femoris kasları retrakte edilerek mikroskop altında addüktör magnusun üzerinde bulunan inen geniküler arter ekspoze edildi (Şekil 1 a,b). Genişliği 4x5 mm olan musküloperiosteal doku femur üzerinden periost elevatörü ile kaldırılıp (Şekil 2a), inen geniküler arter pedikül olmak üzere femoral arter ayırımına kadar diseke edildi (Şekil 2b). Hazırlanan flep kendi üzerine 11/0 prolon sütür ile dikilerek (kambium tabakasının kendi içinde olmasına

Şekil 2a: Periostun pedikülü korunarak femur üzerinden elevasyonu izlenmektedir (16 X), **b:** Periostun elevasyonu tamamlandıktan sonraki görünüm (16 X), **c:** Tutoplast duranın periost üzerine yerleştirilişi görülmektedir (16 X)

dikkat edildi) bir kese haline getirildi. Bu periosteal kese içine aşağıdaki gruplarda belirtilen araştırma materyalleri yerleştirildi (Şekil 2c). Hazırlanan kese (Şekil 2d) kas içine gömüldükten sonra insizyonlar 6/0 katgüt ile kapatıldı.

Ratların gruplandırılması: Her grup 16 rattan oluştu.
Grup 1a: Ratların sol femurlarından hazırlanan



Şekil 2d: Kese kapatıldıktan sonraki görünüm izlenmektedir (16 X)

kesenin içine sağ femurdan alınan kansellöz kemik konuldu.

Grup 1b: Ratların sağ femurlarından hazırlanan kesenin içine "Tutoplast dura" konuldu.

Grup 2b: Ratların sağ femurlarından hazırlanan kesenin içine "Hydroxi apeteite" konuldu.

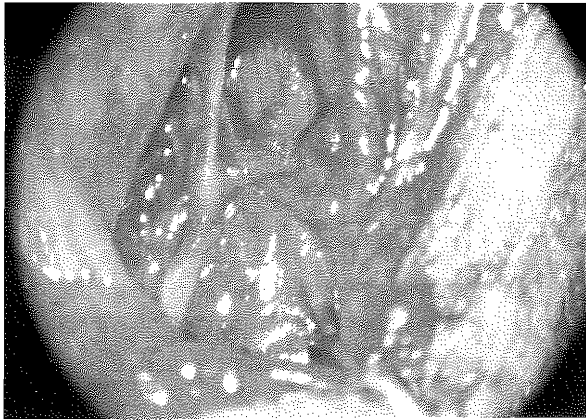
Grup 3a: Ratların sol femurlarından hazırlanan kesenin içine "Bioaktif cam fiberi" konuldu.

Grup 3b: Ratların sağ femurlarından hazırlanan kese boş bırakılarak kontrol grubu oluşturuldu.

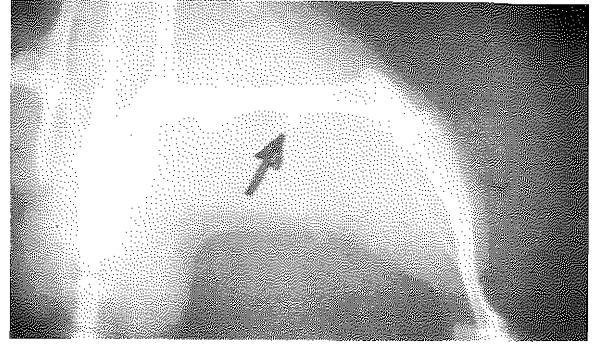
Grup 4: Ratların sol femurlarından hazırlanan kese

Tablo 1: Ratların ve işlemlerin gruplandırılması

Grup	Toplam işlem	Keseye konan madde
1A	16	Kansellöz kemik grefti
1B	16	Tutoplast dura
2A	16	Pyrost
2B	16	Hidroksiapetit
3A	16	Bioaktif cam fiberi
3B	16	Boş
4	16	Tiroid hormonu



Şekil 3: Çevre dokulardan diseke edilen periosteal flep (kese) izlenmektedir. (16 X. Kesenin içinde oluşmuş kompakt kemik izlenmektedir (16 X)



Şekil 4: Radyolojik değerlendirilmede femurun distaline yakın bölgede yumuşak doku içinde yeni oluşmuş kemik dansitesi gözlenmektedir.

boş bırakıldı. Günde 0.02 mg thyroxine Na oral olarak verildi. Postoperatif sonuçlar 3. ayda değerlendirildi. Radyolojik tetkik sonrasında operasyon mikroskopu altında (6 büyütmede) makroskopik değerlendirme yapıldı, burada eski insizyon yerinden girilip diseksiyonla kese bulundu (Şekil 3), pedikülü oluşturan damarların patent olup olmadıkları değerlendirildikten sonra kese dışarı alındı ve histolojik değerlendirme yapıldı. Üç ay sonundaki radyolojik, makroskopik ve histopatolojik sonuçlar tablo 2'de özetlendi.

Grup 1B ve 3A ratlarında radyolojik olarak yeni

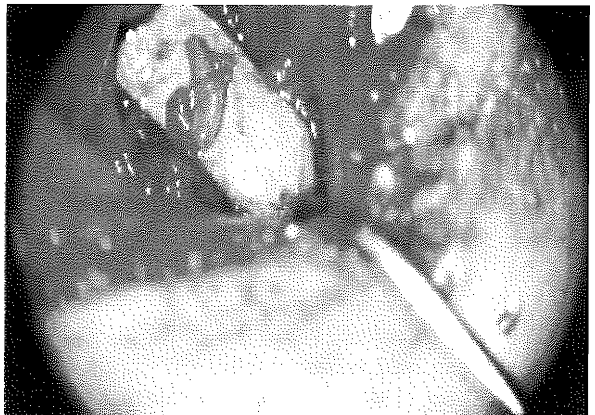
Tablo 2: Gruplara göre yaşayan rat sayısı ve bu ratlarda kemik oluşumunun radyolojik, makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmesi.

Grup	Toplam işlem	Yaşayan rat sayısı	+Radyoloji	+Makroskopi	+Mikroskopi
1A (KKG)	16	12	8	8	11
1B (TD)	16	11	-	-	-
2A (P)	16	11	2	2	3
2B (HA)	16	14	5	6	7
3A (BCF)	16	10	-	-	-
3B (B)	16	14	5	6	6
4 (TH)	16	11	5	6	6

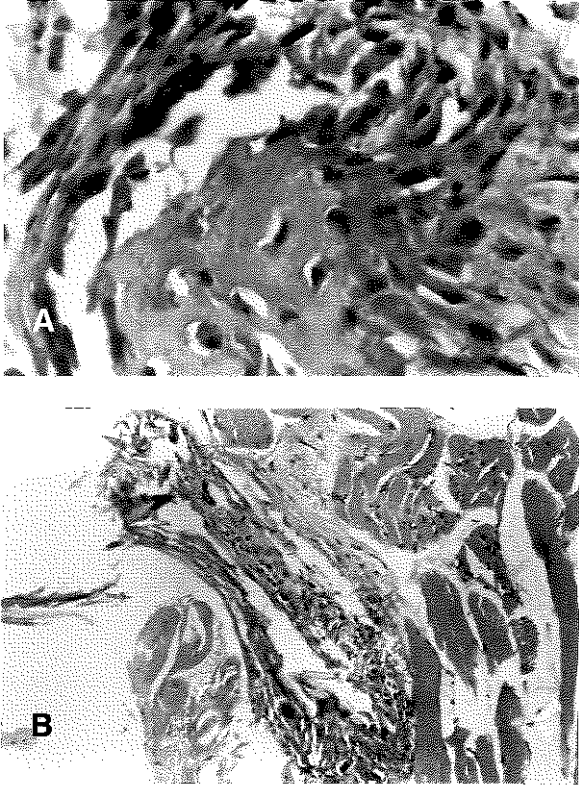
KKG: Kansellöz kemik grefti
BCF: Bioaktif cam fiberi

TD: Tutoplast dura
TH: Tiroid hormonu

HA: Hidroksiapetit
P: Pyrost B: Boş



Şekil 5: Makroskopik olarak kese içinden 6. haftada çıkarılan kemik görülmektedir.



Şekil 6: a. Mikroskopik olarak periost ile çevrili alanda, ortada oluşmuş kemik yapısı ve çevresinde proliferasyon gösteren periosteal hücreler izlenmektedir (H.E. 10X). b. Mikroskopik olarak yeni kemik ve periost reaksiyonu büyütülmüş olarak görülmektedir (H.E. 40X)

oluşmuş kemik görülmedi. 1A da 8, 2A da 4, 2b de 5, 3B de 5 ve 4 te 5 ratta femur yanında daha düşük dansitede görüntülenen yeni kemik oluşumu gözlemlendi (Şekil 4). Makroskopik olarak 1A da 8, 2A da 2, 2B de 6, 3B de 6, 4 te 6 ratta kompakt kemik oluşumu gözlemlendi (Şekil 5). Histopatolojik olarak tüm materyaller hematoksilen eosin boyası ile boyandı. 1A da 11 materyalde kompakt kemik oluşumu gözlemlenirken (Şekil 6'da) diğerlerinde fibröz doku ile karşılaşıldı. 1B de 11 materyalden 6 sında periostun reaksiyon gösterdiği gözlemlendi. Materyallerin hepsinde tutoplast çevre doku ile kaynaşmıştı ve yabancı cisim reaksiyonu yoktu. 2A da 3 ratta, 2b de 7 ratta, 3B de 6 ratta ve 4B de 6 ratta mikroskopik olarak kemik oluşumu gözlemlendi. 3A da materyallerin tümünde fibröz doku ve yer yer etrafı multinükleer yabancı cisim hücrelerince çevrilmiş cam fiberleri gözlemlendi (Şekil 6b).

TARTIŞMA

Periostun osteojenik kapasitesi Ollier'in 1867 deki çalışmasından beri bilinmektedir ^{1,2,3,4,5,6}. İlk klinik çalışmayı Skoog (1967) alveoler yarıklarda maksiller periosteal flepleri kullanarak yapmıştır ⁷. periosteum greft ya da flep olarak transplante edildiğinde yeni kemik

oluşturmaktadır ^{1,2,3,4,5,6,8}, fakat yeni oluşan kemiğin yapısı, seçilen donör alan, periostun vaskülarizasyonu, mekanik uyartım, ağırlık taşıma, ortamda kırık matriksinin varlığı gibi bazı faktörlerle etkilenmektedir ^{1,2,3,5,6,8,9,10}. Periostun kemik oluşturabilme yeteneği kanlanması ile doğrudan ilişkilidir ^{3,5,6,8,10}.

Değişik donör alanlardan (maksillar, tibial veya kosta) elde edilen periost flepleri farklı osteojenik kapasiteye sahiptir ^{8,10}. Puckett'e göre bu olay gerekli uyartımın eksiliğine bağlıdır. Kemik oluşumunda mekanik stres önemli bir faktördür, ve mekanik stres uygulayarak periosttan ağırlık taşıyan kemik elde edilebilmektedir ^{8,10,11}. Takato ve arkadaşları ağırlık taşıma veya mekanik stresin kemiğin yeniden yapılanmasında ve rejenere kemiğin rezorbsiyonunun önlenmesinde önemli rolü olmasına karşın, periosteal osteojenezde önemi olmadığını belirtmiş ve periostun osteojenik kapasitesinin esas olarak periostun hacmine ve vaskülarizasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir ^{5,6}, ayrıca musküloperiosteal flebin osteojenik çalışmayı Skoog (1967) alveoler yarıklarda maksiller periosteal flepleri kullanarak yapmıştır ⁷. periosteum greft ya da flep olarak transplante edildiğinde yeni kemik oluştururmaktadır ^{1,2,3,4,5,6,8}, fakat yeni oluşan kemiğin yapısı, seçilen donör alan, periostun vaskülarizasyonu, mekanik uyartım, ağırlık taşıma, ortamda kırık matriksinin varlığı gibi bazı faktörlerle etkilenmektedir ^{1,2,3,5,6,8,9,10}. Periostun kemik oluşturabilme yeteneği kanlanması ile doğrudan ilişkilidir ^{3,5,6,8,10}.

Değişik donör alanlardan (maksillar, tibial veya kosta) elde edilen periost flepleri farklı osteojenik kapasiteye sahiptir ^{8,10}. Puckett'e göre bu olay gerekli uyartımın eksiliğine bağlıdır. Kemik oluşumunda mekanik stres önemli bir faktördür, ve mekanik stres uygulayarak periosttan ağırlık taşıyan kemik elde edilebilmektedir ^{8,10,11}. Takato ve arkadaşları ağırlık taşıma veya mekanik stresin kemiğin yeniden yapılanmasında ve rejenere kemiğin rezorbsiyonunun önlenmesinde önemli rolü olmasına karşın, periosteal osteojenezde önemi olmadığını belirtmiş ve periostun osteojenik kapasitesinin esas olarak periostun hacmine ve vaskülarizasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir ^{5,6}, ayrıca musküloperiosteal flebin osteojenik kapasitesinin fasyaperiosteal flepten daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Bone Morphogenetic Protein (BMP) kemik oluşumunu indüklemektedir ^{6,12,13,14,15}. İnsan büyüme hormonu kemik hücre proliferasyonunu uyarak uzun kemik büyümesini uyarır ¹⁶. Seyedin osteoindüktif faktör olarak adlandırdığı ve transforme edici büyüme faktörü beta 1 veya 2 ile beraber kullanıldığında ektopik kemik oluşumunu uyaran bir glikoprotein tanımlanmış ve pürifiye etmiştir ¹⁶. Prostaglandin E ve metabolitleri kemik hücrelerini uyarmak için kapasitesine sahiptir ⁴. Bazı tümör

hücreleri (Moloney Sarkomu) ve makrofajlar osteoblast ve kondrositleri uyaran büyüme faktörleri salgırlarlar¹⁷. flurbiprofen (NSAF) osteoblast aktivitesini uyarak periosteal kemik oluşumunu uyarır¹⁸.

Tiroid hormonu (T3) osteoindüktiftir ve var olan ossifikasyon merkezlerinde büyümeye yol açmaktadır¹⁹. T3 kemiğin proliferasyonu ve farklılaşmasını, kartilajın matürasyonunu sağlamaktadır. Deneysel çalışmalarda tiroid hormonu perikondreal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmalarını indüklemektedir. Bizim çalışmamızda tiroid hormon osteojenezi etkilemedi. Tiroid hormonuna cevap düzey ve doz bağımlıdır¹⁹, bizim çalışmamız ratlar üzerinde olduğundan, uygun doz ve düzeyi sağlayamamış olabiliriz.

Osteoblastlar kemik sentezinde kalsifiye kartilaj, eski kemik trabekülü gibi sert çatıları tercih etmekte. Kansellöz kemik grefti, hidroksiapatit, bioaktif cam fiberi osteokondüktif özelliğe sahiptirler ve kemik appozisyonu için çatı görevi görebilirler^{20,21}. Bizim çalışmamızda cam fiberlerinin, hidroksiapatit, pyrost ve kansellöz kemik greftinin osteokondüktif özelliklerinin periosteal keselerin kambium tabakasındaki osteogenetik hücrelerin kemik appozisyonuna öncülük edeceğini düşündük, ancak bioaktif cam fiberleri için yabancı cisim reaksiyonu ve tutoplast dura için fibrozis ile karşılaştık.

Bioaktif cam fiberi kemik oluşumunda kalsifiye kartilaj, septa, rezorbe laküna yüzeyi, eski kemik trabekülü veya nekrotik kemik fragmanları gibi bir çatı görevi görebilir²². Pazzaglia bioaktif cam fiberlerinin kemik bağlama kapasitesinin iki faktörün birleşimi sonucu olduğunu bildirmiştir: maddenin yüzey özellikleri ve alıcı alanda osteojenik hücrelerin varlığı²². Pazzaglia ve arkadaşları bioaktif cam fiberinin kemik iliği üzerindeki osteoindüktif etkisini gösterirken, aynı zamanda bioaktif camın sıkı bağ dokuları ile direkt kimyasal bir bağlantı oluşturduğunu bildirmişlerdir. Pazzaglia'nın çalışmasında da özellikle erken dönemde inflamatuvar reaksiyonun daha az olduğu gösterilmiştir²². Suominen de bioaktif cam granülleri ve plakları ile yaptığı klinik çalışmada özellikle bioaktif cam plakların hacmini koruduğunu, reaksiyon yapmadığını ve kemik ile temas kenarlarında kaynaştığını göstermiştir²³. Çalışmamızda periost içine konan cam fiberleri yabancı cisim reaksiyonuyla sonuçlandı. Fiberlerin yer yer yabancı cisim dev hücrelerince çevrildiği ve orta zonda da imflamasyon dokusu bulunduğu saptandı.

Tutoplast Duranın vaskülerize periost ile sarılmış olması yabancı cisim reaksiyonunu geciktirmiş olabilir. Mikroskopide ise tüm materyallerde duranın bölge dokularından ayırt edilemediği gözlenirken, üç materyalde periost reaksiyonu gözlemlendi (Şekil 2). Tutoplast dura çalışmamızda insandan rata nakledildiğinden aslında bir heterojenik grefttir. Bu nedenle atılım ya da yabancı cisim reaksiyonu olması

beklenir. Ancak böyle bir reaksiyonla karşılaşılması materyalin hazırlanışı sırasında uygulanan işlemlerle ilgili bir madde elde edilmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Periosteal hücrelerin osteogenez için bir uyarıma ihtiyaçları varsa muhtemelen cam fiberleri, Tutoplast dura ve pyrostta uyarım eksikliği olumsuz rol oynamış olabilir. kansellöz kemikten kompakt kemik elde edildi, taze kansellöz kemik greftinin osteogenetik hücreleri ve osteoindüktif proteinleri içermesi diğerlerinden farklı oluşturmaktadır.

HA, Cam fiberi ve pyrost gibi materyaller osteokondüktif özelliğe sahip artifisyal taşıyıcıdır. Bunlar kemiğin üzerlerine veya içine doğru yığılabileceği bir çatıdır. Ancak bu materyaller osteoindüktif bir elemente sahip değildirler. Osteoindüktif bir protein olan BMP taze kemikten izole edilebildiği gibi rekombinan olarak da elde edilebilmektedir. Yapılan çalışmalarda bu maddenin çeşitli taşıyıcılar ile birlikte kullanıldığında, kemik oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Çalışmamızda HA, Cam fiberi ve pyrost ve kansellöz kemiği periost içine sardık. Kansellöz kemiğin ve diğer maddelerden en önemli farkı içinde BMP içermesidir. Bu nedenle kansellöz kemikten daha kolay ve yoğun bir kemik elde ettiğimize inanıyoruz. Bunun karşılaştırmalı çalışması için HA, Cam fiberi ve pyrostu BMP veya benzeri indüktif elementler ile karıştırılarak periosta sarmak uygun olur.

Periosteal kemik oluşumunda çalışmamızın sonuçlarına göre periosttaki osteogenetik hücrelerin bir çatı üzerine kemik oluşturmak için bir uyarıma ihtiyaç duymaktalar. Bizim sonucumuzu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Pazzaglia'nın çalışmasında cam granülleri ile kemik iliği gibi osteoindüktif ajanlar ile osteojenik hücrelerin bir arada bulunduğu ortamda kemik elde edilmesi bu görüşü desteklemektedir. Ayrıca periost flebi ile yapılan çeşitli çalışmalarda da ortamda kırık matriksinin varlığının önemi vurgulanmıştır.

Periost flebi ile yapılacak çalışmalarda BMP, Transforme edici büyüme faktörü 1-2, Prostaglandin E gibi indükleyici ajanların bulunacağı ortamlarda osteogenezin daha hızlı ve yeterli olacağı düşünülebilir.

Sonuç: Periost osteojenik kapasiteye sahiptir. Osteojenik özelliğini en iyi osteokondüktif ve osteoindüktif materyallerin bir arada bulunduğu ortamlarda göstermektedir.

Dr. Metin GÖRGÜ
Mithatpaşa Cad. No: 58/8
Yenişehir / ANKARA

KAYNAKLAR

1. J.J. Heikki & V. A. Ritsila: Behaviour of cancellous bone

- graft with an without periosteal isolation in striated muscle. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 22:47,1988.
2. K.F. King: Periosteal pedicle grafting in dogs. *J. Bone and Joint Surg.* 58B (1):117,1976.
 3. M. C. Romana, & A. C. Masquelet: Vascularized periosteum associated with cancellous bone graft: An experimental study. *Plast. Reconstr. Surg.* 85(4):587,1990.
 4. T. Satoh, M. Tsuchiya&K. Harii: A vascularised iliac musculoperiosteal free flap transfer: a case report. *Br J. Plast. Surg.* 36:109112,1983.
 5. T. Takato, K. Harii & T. Nakatsuka: Osteogenic capacity of vascularised periosteum: experimental study using rib periosteum in rabbits. *Br. J. Plast. Surg.* 41:528532,1988.
 6. T. Takato, K. Harii, T. Nakatsuka, K. Ueda & T. Ootake: Vascularized periosteal grafts: An experimental study using two different forms of tibial periosteum in rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.* 78(4):489,1986.
 7. T. Skoog: The use of periosteum and Surgicel bone restoration in congenital clefts of maxilla: A clinical report and experimental investigation. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 1:113,1967.
 8. C.L. Puckett, J.S. Hurvitz, M.H. Metzler&D. Silver: Bone formation by revascularized periosteal and bone grafts, compared with traditional bone grafts. *Plast.*
 9. J. M. Funley, R.D. Acland&M.B. Wood: Revascularized periosteal grafts a new method to produce functional new bone without bone grafting. *Plast. Reconstr. Surg.* 61(1):1,1978.
 10. F.A.J.M. van der Wildenberg, R.J.A. Goris&M.B.J.E. Tutein: Free revascularised periosteum transplantation: an experimental study. *Br. J. Plast. Surg.* 37:226235,1984.
 11. J. Aronson, B. Harrison, C. M. boyd, D.J. Cannon, H.J. Lubansky&C. Stewart: Mechanical induction of osteogenesis. *Annals of Clinical and laboratory Science.* 18(3):195,1988.
 12. A. Hulth, O. Johnell&A. Henricson: The implantation of demineralized fracture matrix yields more new bone formation than does intact matrix. *Clin. Orthop. and Related Reseach.* 234:235,1988.
 13. S.M. Seyedin: Osteoinduction: A report on discovery and research of unique protein growth factors mediating bone development. *Oral Surg. Med. Oral Pathol.* 68(4):527,1989.
 14. K. Takaoka, H. Nakahara, H. Yoshikawa, K. Masuhara, T. Tsuda&K. Ono: Ectopic bone induction on and in prous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop. and Related Research.* 234:250,1988.
 15. T. Miki, Y. Imai: Osteoinductive potential of freeze-dried, biodegradable, poly (glycolic acid-co-lactic acid) disks incorporated with bone morphogenetic protein in skull defects of rats. *Int. J. Oral Maxillofac. surg.* 25:402-6,1996.
 16. S. Downes, D. J. Wood, A. J. Malcolm & S.Y. Ali: Growth Hormone in Palymethylmethacrylate Cement. *clin. Orthop. and Related Research.* 252:294,1990y20.
 17. K.H. Wlodarski: Indomethacin influences moloney's sarcoma and associated periosteal osteogenesis in the mouse. *Acta Orthop. Scand.* 61(5):427-30,1990.
 18. W.S.S. Jee, X.J. Li, Y.L.Li: Flurbiprofen-induced stimulation of periosteal bone formation and inhibition of bone resorption in older rats. *Bone* 9:381,1988.
 19. J. Hanken & B.K. Hall: Skull development during anuran metamorphosis *Anat. Embryol.* 178:219277,1988.
 20. W. Stanford: boneinducing materials: their place in Dentistry. *Inter. Dental J.* 37:162168,1987.
 21. H. V. Rosen, M.M. McFarland: The biologic behavior of hydroxiapatite implanted into the maxillofacial skeleton. *Plast. Reconstr. Surg.* 85(5):718,1990.
 22. U. E. pazzaglia, C. Gabbi, B. Locardi, A. di Nucci, G. zatti & P. Cherubino: Study of te osteoconductive properties of bioactive glass fibers. *J Biomed. Mat Reseach* 23:12891297,1989.
 23. R. Suominen, J. Kinnunen: Bioactive glass granules and plates in the reconstruction of defects of the facial bones. *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.* 30:281-9,1996.