

T. Rose^{1,2,3} · H. Peng¹ · A. Usas¹ · C. Josten³ · F. H. Fu² · J. Huard¹

¹ Growth and Development Laboratory, Department of Orthopaedic Surgery, Children's Hospital and University, Pittsburgh/PA, USA

² Department of Orthopaedics, University, Pittsburgh/PA, USA

³ Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universität, Leipzig

Ex-vivo-Gentherapie mit BMP4 bei kritischen Substanzdefekten und Frakturen im osteoporotischen Tiermodell

Die Heilung von langstreckigen Knochendefekten, wie nach Tumorresektion, Osteiitis oder Hochrasanztrauma ist weiterhin ein klinisches Problem. Die möglichen Therapieansätze sind mannigfaltig. Kleinere Defekte können mit autologen Material, welches meist aus dem Beckenkamm gewonnen wird, wie Spongiosa oder kortikospongiöse Späne, gefüllt werden [1]. Die chirurgische Versorgung größerer Defekte bedarf vaskularisierter Knochentransplantate, Allograftersatz oder Segmenttransport [2, 3, 4]. All diese Prozeduren haben jedoch aufgrund ihres invasiven Charakters eine hohe Komplikations- und Misserfolgsrate, charakterisiert durch eine lange Hospitalisations- und Wiederherstellungszeit für den Patienten.

Die Osteoporose stellt durch das erhöhte Risiko eine Fraktur zu erleiden ein weiteres entscheidendes Problem in der Unfallchirurgie und Orthopädie dar. Jüngste Studien im Tiermodell haben jedoch auch gezeigt, dass die Heilung der osteoporotischen Fraktur selbst durch die geringeren biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus verzögert abläuft [5, 6, 7, 8]. Als Ursachen hierfür werden die geringeren TGF- β -Spiegel während der endochondralen Ossifikation im osteoporotischen Knochen diskutiert [5, 9, 10, 11].

Nach der ersten Beschreibung der osteoinduktiven Kapazität von demineralisierter Knochenmatrix von Urist 1965 [12] wurde der Einsatz der BMP bereits 1982 von der gleichen Arbeitsgruppe für die Heilung von kritischen Substanzdefekten im Rattenfemur eingesetzt [13]. Darauf folgende Studien zeigten ebenfalls den erfolgreichen Einsatz der Proteine in der spinalen Fusion, Implantatstabilisation und bei Osteoporose [14, 15]. Die zellvermittelte Expression der BMP mittels Ex-vivo-Gentherapie eröffnet in der Therapie problematischer Knochenläsionen, bei denen die natürliche biologische Regenerationspotenz nicht zur funktionellen Heilung ausreicht, neue Perspektiven.

In vorangegangenen Studien wurden in Gentechnik modifizierte, mit dem BMP-Gen implementierte Carrier-Zellen bereits erfolgreich für die Knochenneubildung entwickelt [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Die Effektivdosis des BMP ist dabei für die Knochenbildung um ein Mehrfaches geringer als bei der traditionellen Einmalgabe. Die Knochenmarkzellen erscheinen aufgrund ihres osteogenen Charakters das geeignete Transportmedium des Proteins für die Knochenheilung zu sein [17, 24], was deren erfolgreichen Einsatz in verschiedenen Studien belegt [17, 25]. Es wurden jedoch auch weitere Zellpopulationen für den Pro-

teintransport in der gentherapeutischen Behandlung von Knochendefekten entwickelt. So wurden positive osteogene Effekte auch bei der Verwendung von nichtosteogenen Carrier-Zellen, wie Skelettmuskelzellen [25, 26], Chondrozyten [25] und Fibroblasten der Haut [25, 27], beobachtet.

Gegenüber der Gewinnung von Knochenmarkzellen durch mehrfache Knochenbiopsien stellt die Zellisolation aus anderen Strukturen, wie Haut und Muskel, ein weniger invasives klinisches Verfahren dar. Für den möglichen klinischen Einsatz ist die suffiziente Verfügbarkeit, eine einfache Isolation, die schnelle Expansion und eine effektive Gentransduktion der Carrier-Zellen unbedingte Voraussetzung. Myofibroblasten mit Expression des BMP4 erfüllen diese Voraussetzungen und es wurden bereits in früheren Studien ihre osteogenen Eigenschaften im Mausmodell bewiesen [23, 28, 29].

Hypothesen

Die 1. Hypothese dieses Projekts ist, dass retroviral transduzierte Zellen muskulären Ursprungs mit einer ausreichenden BMP4-Expression eine endochondrale Ossifikation initialisieren und einen Knochendefekt heilen können. Die 2. Hypothese ist, dass durch die zellvermittelte Applikation von

Unfallchirurg 2005 · 108:25–34
DOI 10.1007/s00113-004-0888-6
© Springer Medizin Verlag 2004

T. Rose · H. Peng · A. Usas · C. Josten · F. H. Fu · J. Huard

Ex-vivo-Gentherapie mit BMP4 bei kritischen Substanzdefekten und Frakturen im osteoporotischen Tiermodell

Zusammenfassung

Problematische Knochenläsionen wie Frakturen bei Osteoporose und Segmentdefekte besitzen eine verminderte biologische Regenerationspotenz. Die zusätzliche Applikation von Wachstumsfaktoren in Verbindung mit der Ex-vivo-Gentherapie könnte hierfür eine mögliche Therapiemethode darstellen.

Aus der Muskulatur von Ratten wurden Myofibroblasten isoliert und retroviral transduziert, um eine Expression von „Bone-morphogenic-Protein 4“ (BMP4) zu erreichen. Der Einfluss dieser Zellen auf die Knochenneubildung wurde nach der lokalen Anwendung in knöchernen Segment-

defekten sowie in Frakturen osteoporotischer Knochen der Ratte untersucht.

Die Ex-vivo-Gentherapie isolierter Myofibroblasten konnte durch die zellvermittelte Applikation von BMP4 kritische Substanzdefekte im Femur der Ratte nach 12 Wochen überbrücken und knöchern überbauen. Die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen zeigte 4 Wochen nach Ex-vivo-Gentherapie eine vermehrte Kallusbildung gegenüber Frakturen im osteoporotischen Knochen ohne Therapie.

Die Ex-vivo-Gentherapie stellt eine vielversprechende Therapiemethode bei osteoporotischen Frakturen und Segment-

defekten dar. Geringere Komplikationen (Pseudarthrosen, Repositionsverlust, Fragmentdislokation), kürzere Hospitalisationszeiten sowie Verbesserung der Knochenqualität stellen dabei wichtige klinische Aspekte dar.

Schlüsselwörter

Ex-vivo-Gentherapie · Bone-Morphogenic-Protein (BMP) · Osteoporose · Frakturheilung · Segmentdefekt

Treatment of critically sized defects and enhancement of fracture healing in an osteoporotic animal model based on ex vivo gene therapy using BMP4

Abstract

Fractures in osteoporotic bones or segment defects are problematic bone lesions with a reduced biological capability of regeneration. We tested the hypothesis that cell-mediated ex vivo gene therapy to deliver BMP4 can heal critically sized defects and improve bone healing in osteoporotic rats.

Primary muscle-derived cells were isolated from the hindlimb muscle of rats and retrovirally transduced to express bone morphogenic protein 4 (BMP4). The bone formation was evaluated following local application of these cells in critically si-

zed defects and in fractures of osteoporotic bones.

Radiographic analysis revealed bridging callus formation in a critically sized defect in all specimens using muscle-derived cells expressing BMP4 at 12 weeks. These findings were confirmed by histological evaluation, which revealed callus bone formation with good integration to the distal and proximal bone. Following treatment with muscle-derived cells expressing BMP4, the bone healing process in the osteoporotic bone was improved to the level similar to that of normal bone.

The ex vivo gene therapy could be a promising tool for the treatment of osteoporotic fractures and critically sized defects. The reduced number of complications (nonunions, loss of reduction, and fragment dislocation), shortening of hospitalization period, and improvement of bone strength are decisive advocates for this treatment option.

Abstract

Ex vivo gene therapy · Bone morphogenic protein (BMP) · Osteoporosis · Fracture healing · Segment defect

BMP₄ die Knochenneubildung im osteoporotischen Knochen nach Osteotomie verbessert werden kann.

Material und Methoden

Isolation von Myofibroblasten aus dem Skelettmuskel

Aus dem Hinterläufen von Fischer 344 Ratten wurden Myofibroblasten (MFB) isoliert und angezüchtet [30]. Nach einer enzymatischen Schritt-für-Schritt-Dissoziation wurden die Zellen zusammen mit einem Nährmedium (bestehend aus „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM) mit 10% fetalen Kälberserum, 10% Pferdeserum, 5% Hühnerembryoextrakt und 1% Penizillin-Streptomycin) in kollagenbeschichteten Kulturflaschen eingebracht. Die nach 1 h dem Boden anhaftenden Zellen wurden für die weitere Zellkultivierung und zur retroviralen Transduktion verwendet.

Präparation des retroviralen Vektors

Die virale Vektor-DNA wurde in einen replikationsdefekten Virus entsprechend einer bereits beschriebenen Transfektionstrategie eingebaut [28]. Zur kurzen Erläuterung: GP-293-Zellen (BD Clontech[®], Palo Alto/CA, USA) wurden mit dem Plasmid CLBMP₄ mittels Kalzium-Phosphat-Niederschlagstechnik mit pVSVG (BD Clontech[®], Palo Alto/CA, USA) co-transfiziert. Der virale Vektor wird als „Retro-BMP₄“ bezeichnet (hergestellt durch: Dr. Hairong Peng, „Growth and Development Laboratory“ der University of Pittsburgh/PA, USA).

Transduktion der Zellen mit retroviralem Vektor

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90–100% mit dem Retro-BMP₄ am Tag 1 transduziert. Die Transduktion wurde nach 12 und 24 h in gleicher Weise wiederholt. Das gleiche Vorgehen, jedoch mittels eines LacZ-transportierenden Retrovirus (Reportergen ohne Proteinexpression), wurde für die Myofibroblasten der Vergleichsgruppe wiederholt. Die mit Retro-BMP₄ transduzier-

ten Myofibroblasten werden folgend als MFB-BMP₄ und die mit Retro-LacZ transduzierten Myofibroblasten als MFB-LacZ bezeichnet.

Nachweis der alkalischen Phosphatase

Etwa 800.000 retroviral transduzierte Zellen (Retro-BMP₄) wurden pro Zellkammer in einer 6-Well-Platte kultiviert. Nach 48 h wurde das Nährmedium entfernt und das Staining für alkalische Phosphatase mittels Sigma AP kit 86-c[®] (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis/MO, USA) durchgeführt.

„Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Die Bestimmung der BMP₄-Konzentration im Nährmedium nach Zellkultivierung erfolgte mit dem Quantikine[®] Human BMP-4 Immunoassay (R&D Systems[®], Minneapolis/MN, USA). Die Zellen (MFB-BMP₄) wurden entsprechend der oben beschriebenen Methode bis zu einer 90%igen Konfluenz kultiviert. Das Nährmedium wurde nach 72 h gewechselt und gesammelt. Durch optische Dichtemessung wurde die BMP₄-Konzentration ermittelt. Daraus wurde die BMP₄-Expression pro 24 h und 1 Mio. Zellen errechnet.

Tiermodelle

Alle beschriebenen Maßnahmen im Rahmen der Tierversuche wurden zuvor vom „Animal Care and Use Committee of the Children's Hospital of Pittsburgh“ begutachtet und befürwortet.

Tiermodell – Segmentdefekt

An insgesamt 44 adulten „Fischer 344“ Ratten wurde am rechten Femur eine Polyethylenplatte (23×4×4 mm) mit jeweils 2 Pins bikortikal distal und proximal befestigt. Danach wurde ein 7-mm-Segmentdefekt in der mittleren Diaphyse geschaffen. Die Einteilung in 3 verschiedene Gruppen erfolgte entsprechend des therapeutischen Prozedere.

- Die Therapie der Segmentdefekte in Gruppe 1 (MFB₇₅-BMP₄; n=14) erfolgte mit jeweils 5 Mio. transduzierten (Retro-BMP₄) Myofibroblas-

Hier steht eine Anzeige
This is an advertisement

12 Wochen

Abb. 1a-c ▶ Röntgenaufnahmen des Segmentdefekts 12 Wochen nach Therapie: MFB-LacZ-Gruppe, bei Implantation von Zellen ohne BMP4-Expression zeigt sich keine Knochenformation im Segmentdefekt nach 12 Wochen. Die geringen BMP4-Konzentrationen in der Gruppe MFB22-BMP4 waren nicht ausreichend nach 12 Wochen radiologisch nachweisbaren Kallus zu bilden. Nach 12 Wochen zeigt sich bei der Verwendung der Zellen mit hoher BMP4-Expression eine vollständige knöchernen Überbrückung des Segmentdefekts

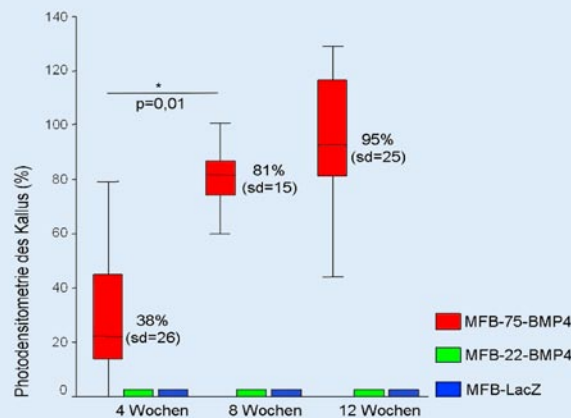
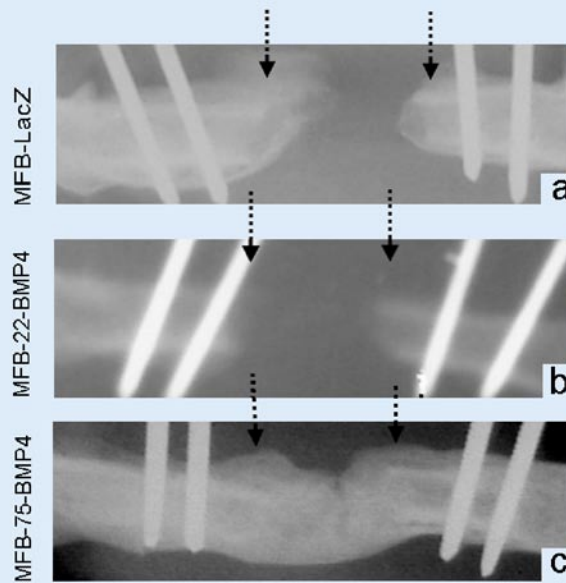


Abb. 2 ▶ Relative Photodensitometriewerte des neu gebildeten Kallus im Segmentdefekt 4, 8 und 12 Wochen postoperativ im Vergleich zur gesunden Gegenseite

- ten (Expression von 75 ng BMP4 in 24 h/1 Mio. Zellen).
- Die Therapie der Segmentdefekte in Gruppe 2 (MFB22-BMP4; $n=20$) erfolgte mit jeweils 5 Mio. transduzierten Myofibroblasten (Expression von 22 ng BMP4 in 24 h/1 Mio. Zellen).
 - Die Gruppe 3 (MFB-LacZ; $n=10$) diente als Kontrollgruppe, in welcher die Therapie mit jeweils 5 Mio. Retro-LacZ-transduzierten Myofibroblasten erfolgte (ohne BMP4-Expression).

Die unterschiedliche Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen war durch eine limitierte Verfügbarkeit einzelner Zellpopulationen zu Beginn der Studie hervorgerufen.

Tiermodell – Osteotomiedefekt in osteoporotischen Ratten

Die verwendeten 30 Fischer-344-Ratten hatten ein Alter von 10 Wochen. Davon wurden 20 entsprechend des beschriebenen Osteoporosemodell der Ratte [31] beidseits ovariectomiert. Die verbleibenden 10 Ratten dienten als gesunde Kontrollgruppe. Der Substanzverlust des Knochens wurde nach weiteren 3 Monaten anhand von Mikro-CT-Untersuchungen der Spongiosastruktur des Tibiakopfes gemessen

Im Alter von 5 Monaten Die Befestigung einer Polyethylenplatte (23x4x4 mm) am rechten Hinterlauf erfolgte mit jeweils 2 Pins bikortikal anterolateral am Femur. Nach Osteotomie der Diaphyse mit einem 1-mm-Schneidbohrer wurden die ovariectomierten Ratten in 2 Gruppen eingeteilt. In der osteoporotischen Kontrollgruppe

(OK; $n=10$) wurden jeweils 3 Mio. Retro-LacZ-transduzierte Myofibroblasten implantiert. Die osteoporotische Therapiegruppe (OT; $n=10$) wurde mit 3 Mio. Retro-BMP4-transduzierten Myofibroblasten therapiert. Die nichtovariectomierten Ratten dienten als vergleichende normale Kontrollgruppe (NK; $n=10$), bei denen keine Zellimplantation erfolgte.

Auswertung des kritischen Substanzdefekts

Röntgen und Photodensitometrie

Die radiologische Auswertung erfolgte anhand von planaren a.-p.-Röntgenaufnahmen. Zur Quantifizierung des neu gebildeten kalzifizierten Kallus wurde die Photodensitometrie des Kallus analysiert. Die ermittelten Werte des neu gebildeten Kallus wurden mit den Normalwerten der Gegenseite dividiert. Das Ergebnis stellt die prozentuale photodensitometrische Knochendichte des neu gebildeten Kallus im Vergleich zu gesunden Gegenseite dar.

Histologie

Die Femura der Ratten wurden in situ exzidiert und weitestgehend vom Weichteilgewebe freipräpariert und danach in 10%iger neutral gepufferten Formaldehydlösung fixiert. Die histologischen Schnitte von 4 μ m Dicke erfolgten in longitudinaler Richtung entlang des Knochenmitte. Für die Färbung wurde Hämatoxylin/Eosin (HE) sowie zur Beurteilung der Knorpelsubstanz Alzian-Blue verwendet.

Auswertung der Osteotomiezone

Mikro-Computertomographie

Die in Formaldehyd fixierten Spezimen wurden in einen zylindrischen Probenhalter eingebracht und wurden mittels eines Mikro-CT-Scanners von proximal nach distal eingescannt (μ -CT40°, Scanco Medical, Bassersdorf, Schweiz).

Der Messvorgang erfolgte in einer Schichtdicke von 10,4 μ m. Das errechnete Knochenvolumen (KV) repräsentiert den absoluten Anteil neu geformten Knochens im gescannten Areal (region of interest, ROI).

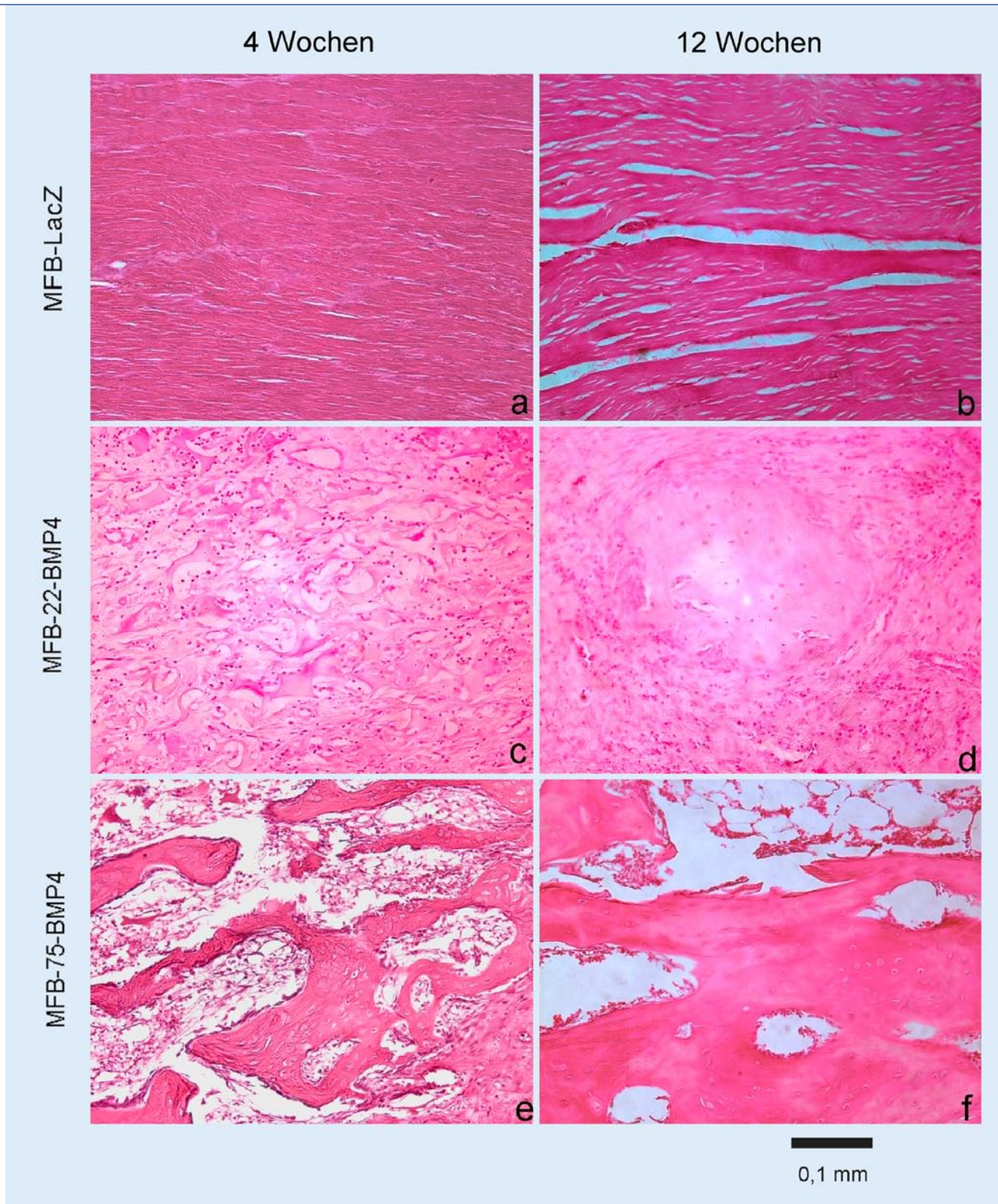


Abb.3a-f ▲ Histologische Aufarbeitung der Segmentdefekte 4 und 12 Wochen postoperativ in den Therapiegruppen (HE-Färbung; Originalvergr. 40:1) MFB-LacZ-Gruppe: Der Segmentdefekt war nach 4 und 12 Wochen vollständig mit Narbengewebe ausgefüllt. Eine knöcherne Defektheilung blieb aus. MFB22-BMP4-Gruppe: Nach 4 und 12 Wochen haben sich vereinzelte Knochenlamellen ausgebildet, die jedoch zu keiner knöchernen Überbrückung des Defektes führten. MFB-75-BMP4 Gruppe: Nach 4 Wochen formten sich ungeordnete Knochenstrukturen, die sich nach 12 Wochen in regulären kortikalen Knochen umbildeten

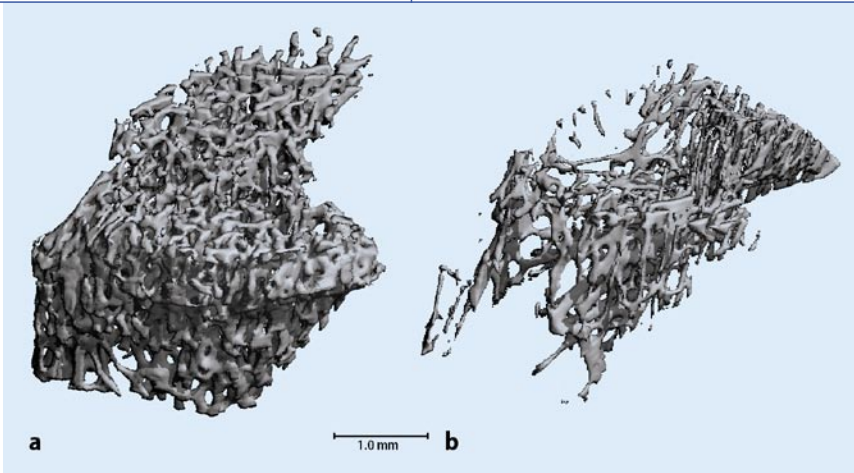


Abb. 4 ▲ Trabekuläre Knochenstruktur in der proximalen Tibia (a) in einer normalen 5 Monate alten Fischer-344-Ratte und (b) in gleichaltrigen ovariektomierten Ratten

Auswertung der Spongiosastruktur in der proximalen Tibia

Zur Evaluierung der Effektivität der Ovariectomie (OVX) bezüglich der Ausbildung einer osteoporosetypischen Knochenstruktur wurden 7 Tibiaköpfe von normalen Ratten ohne OVX und 7 Tibiaköpfe von OVX-Ratten im Mikro-CT gescannt und ausgewertet. Eine Schichtdicke von 16,6 µm wurde im Messvorgang verwendet. Das totale Scanvolumen (TV) und das KV wurde gemessen und zur Kalkulation des Verhältnis Knochenvolumen:Totalvolumen (KV/TV) verwendet. Die Dichte der Trabekelkreuzungspunkte (Tb.K), die Trabekeldicke (Th.D) und die Trabekelanzahl (Tb.A) wurde ebenfalls errechnet. Der Grad der Anisotropie wurde als nichtparametrischer Wert zur Beurteilung der dreidimensionalen (3D-)Anordnung der Trabekel herangezogen [32].

Statistische Analyse

Die Tests wurden zweiseitig geprüft und die Festlegung des Signifikanzniveaus erfolgte auf $p < 0,05$. Zur Evaluierung möglicher Unterschiede eines Merkmals zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test, oder bei kleineren Stichproben der exakte Test nach Fischer, verwendet. Die einfaktorielle ANOVA erfolgte beim Vergleich der Mittelwerte von mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Bei einem signifikanten

Unterschied in diesem Globaltest diente der post-hoc Test als Paarvergleich.

Ergebnisse

In-vitro-Ergebnisse

Die BMP4-Expression der retroviral transduzierten Zellen wurden mittels ELISA ermittelt. Es resultierten Myofibroblasten mit geringerer Proteinexpression von 22 ng BMP4/1 Mio. Zellen innerhalb von 24 h (MFB22-BMP4-Gruppe) und Myofibroblasten mit höherer Proteinexpression von 75 ng BMP4/1 Mio. Zellen innerhalb von 24 h (MFB75-BMP4-Gruppe). Das negative Staining der Myofibroblasten für die alkalische Phosphatase nach Zugabe von BMP4 weist darauf hin, dass eine osteogene Differenzierung der Myofibroblasten in vivo nicht zu erwarten ist. Die Zellen fungieren somit lediglich als Transportmittel (Carrier) und Produktionsstätte für das BMP4.

Knöcherner Überbrückung des Segmentdefekts

Die Auswertung der Röntgenbilder zeigte, dass in der MFB75-BMP4-Gruppe bereits 4 Wochen postoperativ ein deutlicher Brückenkallus im Bereich des Segmentdefekts vorhanden war. Am Ende des gesamten Untersuchungsintervalls nach 12 Wochen wiesen alle Segmentdefekte in dieser Gruppe einen deutlichen Brückenkallus auf (Abb. 1c). Die photodensitometrische Messung zu diesem Zeitpunkt er-

gab im Mittel eine 95%ige Knochendichte ($SD=25$) im neu gebildeten Kallus im Vergleich zum gesunden Knochen der Gegenseite. Eine signifikante ($p=0,01$) Steigerung der Photodensitometrie wurde zwischen der 4. und der 8. Woche gemessen (Abb. 2). Die röntgenologischen Untersuchungen in der MFB22-BMP4- und in der MFB-LacZ-Gruppe ergab zu keinem Untersuchungszeitpunkt den Hinweis auf eine knöcherner Überbrückung des Segmentdefektes (s. Abb. 1a, b).

Die radiologischen Ergebnisse wurden von den Ergebnissen der histologischen Aufarbeitung zu den einzelnen Nachuntersuchungszeitpunkten bestätigt (Abb. 3). Bereits nach 4 Wochen wurde der Segmentdefekt der MFB75-BMP4-Gruppe von Knorpelgewebe und ungeordneten Knochenstrukturen überbrückt. Die Umbildung in kortikalen Knochen mit dem vollständigen Verschwinden von Knorpelgewebe konnte in dieser Gruppe am Ende des Follow-up 12 Wochen postoperativ beobachtet werden. Demgegenüber war eine nur geringe und sporadische Knochenbildung im Segmentdefekt zu beobachten, wenn die Myofibroblasten mit geringer BMP4-Expression verwendet wurden (MFB22-BMP4).

Nach 4 Wochen war die Ausbildung von wenigen zarten Knochenlamellen in vereinzelt Regionen zu sehen, wobei Knorpelzellen nicht nachweisbar waren. Nur vereinzelte Knochenareale waren 12 Wochen postoperativ im Segmentdefekt zu finden. Eine Tendenz zur Überbrückung des Defekts lag nicht vor. Weder Knorpel- noch Knochenformationen wurden in der Kontrollgruppe (MFB-LacZ) zu allen Zeitpunkten beobachtet. Der Segmentdefekt war zu jeder Zeit mit Narbengewebe ausgefüllt.

Frakturheilung im osteoporotischen Knochen

Einfluss der Ovariectomie auf die Knochenstruktur

Der trabekuläre Knochenanteil im Totalvolumen (KV/TV) war in der Gruppe der ovariektomierten Ratten (OVX) signifikant ($p < 0,01$) geringer im Vergleich zu der Gruppe ohne Ovariectomie (Abb. 4). Alle weiteren histomorphometrischen Parameter der Knochenmikrostruktur wie

Tb.K., Tb.A und Tb.D zeigten signifikante Veränderungen nach Ovariectomie im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Ovariectomie. Der Grad der Anisotropie (AI) war in der OVX-Gruppe signifikant höher als in der Normalgruppe. Alle gemessenen histomorphometrischen Merkmale zeigten typische Veränderungen des osteoporotischen Umbaus 3 Monate nach Ovariectomie.

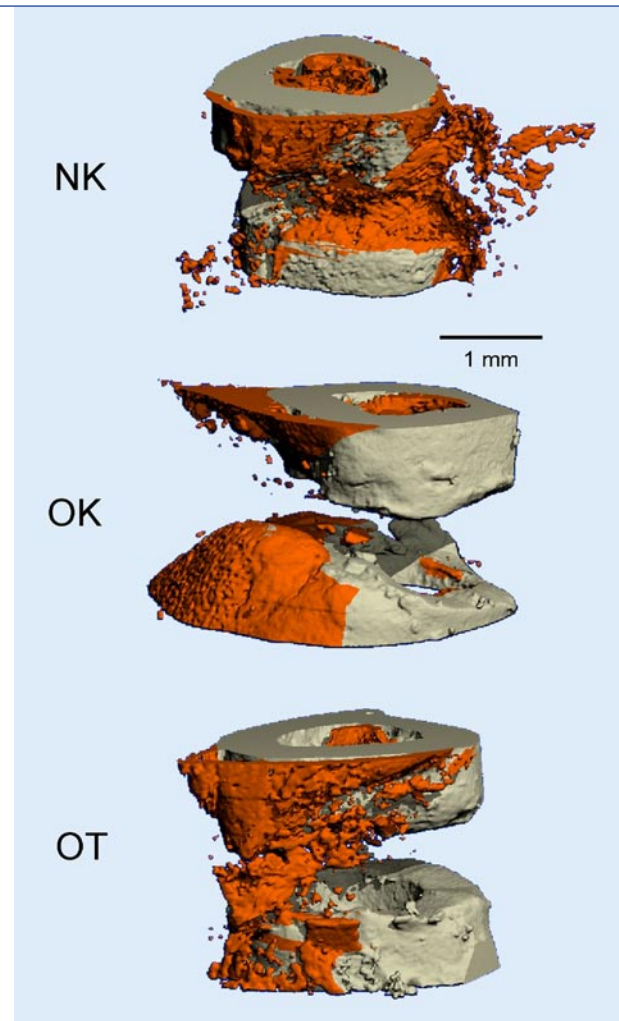
Kallusbildung im Osteotomiebereich

Das gemessene Knochenvolumen (KV) kennzeichnet die Menge an neu gebildeten Knochen im Bereich der Osteotomiezone (■ **Abb. 5**). Das mittlere KV, welches innerhalb der RIO 4 Wochen nach Osteotomie gemessen wurde, war in der NK-Gruppe mit $2,7 \text{ mm}^3$ ($SD=1,3$) signifikant ($p<0,05$) größer als das KV in der OK-Gruppe mit $1,1 \text{ mm}^3$ ($SD=0,5$). Die Berechnung des KV in der OT-Gruppe ergab $3,0 \text{ mm}^3$ ($SD=1,0$), was eine signifikante ($p<0,05$) Steigerung des KV durch die Ex-vivo-Gentherapie mit Retro-BMP4-transduzierten Myofibroblasten bedeutete. Ein Unterschied im KV zwischen der NK- und der OT-Gruppe konnte dabei nicht festgestellt werden ($p=0,95$). Es wurde eine signifikante Verringerung des neu gebildeten Knochenvolumens im osteoporotischen Knochen nach Osteotomie gemessen, was durch die Ex-vivo-Gentherapie soweit gesteigert werden konnte, dass zwischen osteoporotischen Knochen und normalen Knochen keine signifikanten Unterschiede in der Menge der Knochenneubildung vorhanden waren.

Diskussion

Myofibroblasten sind nach retroviraler Transduktion mit Retro-BMP4 in der Lage Segmentdefekte langer Röhrenknochen in der Ratte knöchern zu überbrücken und zu heilen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Knochenheilung bei osteoporotischen Ratten nach Osteotomie gegenüber normalen Ratten durch eine verminderte Kallusbildung gekennzeichnet ist. Die lokale Anwendung von retroviral transduzierten Myofibroblasten (mit BMP4-Expression) konnte zu einer deutlichen Verbesserung der Kallusformation bei diesen Tieren führen.

Abb. 5 ▶ 3D-Rekonstruktion der Osteotomiezone 4 Wochen nach Therapie (braun dargestellte Areale stellen den neu gebildeten Kallus 4 Wochen nach Osteotomie dar; NK Normalgruppe ohne Therapie, OK osteoporotischer Knochen ohne BMP4-Therapie, OT osteoporotischer Knochen mit BMP4-Therapie)



Seit dem Erscheinen des Schlüsselartikels von Urist im Jahr 1965 [12], welcher die Existenz osteoinduktiver Stoffe in demineralisierter Knochenmatrix beschreibt, haben eine Vielzahl von Autoren bei der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der BMP-Dosis und der Knochenbildung festgestellt, dass die Erhöhung von BMP in einer vermehrten und beschleunigten Knochenbildung resultiert [33, 34, 35]. Die Ergebnisse der Studien haben gezeigt, dass die Knochenbildung in vivo eine Abhängigkeit gegenüber der BMP-Dosierung aufweist, und dass eine Minimalkonzentration der BMP vorhanden sein muss, um eine therapierelevante Knochenbildung zu erreichen. Demgegenüber sind die Proteinkonzentrationen wie sie bei der Ex-vivo-Gentherapie notwendig sind, um ein tausendfaches geringer als bei der traditionellen Proteinapplikation.

In einer Studie von Lieberman et al. [17] wurde die erfolgreiche knöcherne Heilung eines kritischen Defekts im Femur-

knochen der Ratte durch indirekte zellvermittelte Gentherapie erreicht. Als Vergleichsgruppen dienten Knochendefekte, welche mit einer Proteinmenge von $20 \mu\text{g}$ BMP2 bestückt wurden. Eine Gruppe ohne BMP2-Therapie diente als Vergleichsgruppe. Die histomorphometrische Analyse ergab bei der zellvermittelten Applikation des BMP2 eine robustere Raster in der Knochenformation gegenüber der Gruppe mit einfacher Proteinapplikation. Als Ursache hierfür wird die kontinuierliche und physiologische Freisetzung des therapeutischen Proteins durch die Carrier-Zellen diskutiert. Diese kräftigere osteogene Reaktion ist wahrscheinlich auf autokrine Kreisläufe zurückzuführen, welche dabei eine bedeutende Rolle spielen [36]. Im vorgestellten Versuchsablauf konnten Myofibroblasten retroviral so transduziert werden, dass diese in der Lage waren BMP4 zu exprimieren.

Die unterschiedliche Dosis der BMP4-Expression zwischen der MFB22-BMP4-

und der MFB75-BMP4-Gruppe könnte mit den unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Myofibroblasten erklärt werden. Für die Zellkultivierung in beiden Therapiegruppen wurden verschiedene Spendertiere unterschiedlichen Alters verwendet. Da die Teilungsrate der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Transduktionsrate durch den Retrovirus hat, könnte z. B. eine langsamere Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen *in vitro* zu einer geringeren Expression des BMP4 geführt haben. Die zellvermittelte Applikation einer suffizienten BMP4-Dosis (MFB75-BMP4) führte in der vorgestellten Studie zu einer ausreichenden Kallusbildung im Segmentdefekt und führte zur Heilung eines kritischen Substanzdefekts. Dieser neu gebildete Knochen hatte 12 Wochen postoperativ histomorphometrisch eine vergleichbare Charakteristik wie die normale kortikale Knochenstruktur. Die photodensitometrischen Werte im Röntgen ergaben ebenfalls eine hohe Knochendichte, die eine Heilung des Segmentdefekts belegte.

Der negative Nachweis der Alkalischen Phosphatase in den Myofibroblasten unter BMP4-Einfluss konnte zeigen, dass eine osteogene Eigenschaft dieser Zellen nicht vorliegt. Eine osteogene Differenzierung der Myofibroblasten *in vivo* ist somit unwahrscheinlich. Dies weist darauf hin, dass die Myofibroblasten nur als Carrier für das BMP4 fungieren und selbst nicht an der Kallusbildung teilnehmen. Die zelluläre Komponente der endochondralen Ossifikation muss somit durch undifferenzierte Stammzellen oder osteogene Vorläuferzellen im Defektgebiet selbst erfolgen. Diese mehrschrittige und sequentielle Kaskade wird durch Chemotaxis, Mitose und Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten und Knochen charakterisiert [37]. Die Ergebnisse der vorgestellten Studie haben gezeigt, dass mit einer ausreichenden BMP4-Konzentration im Knochendefekt diese Kaskade gestartet werden kann, und ein vollständiger Umbau des Kallus in kortikalen Knochen möglich ist.

Die Verwendung der Myofibroblasten mit Expression des BMP4 führte bei Segmentdefekten im Femur der Ratte zu einer knöchernen Überbrückung. Knöcherne Segmentdefekte sind jedoch nur seltene Komplikationen nach Hochrasanztrau-

men, Tumorresektionen oder Infektionen. Demgegenüber spielt die Problematik der Therapie osteoporotischer Frakturen eine immer größere Rolle im klinischen Alltag des Unfallchirurgen. Untersuchungen im osteoporotischen Knochen ovariektomierter Ratten haben bewiesen, dass die Imbalance zwischen Knochenresorption und Knochenbildung nicht nur Einfluss auf die intakte Knochenstruktur mit einem folglich erhöhten Frakturrisiko hat, sondern auch die Frakturheilung beeinträchtigt [5, 6, 7, 38]. Dies zeigt sich einmal in einer verringerten biomechanischen Stabilität des geheilten Knochens [5, 6, 7], in einer verringerten Kallusgröße [5] sowie in einer verlängerten osteochondralen Ossifikation mit vermehrten Knochenumbau [5] insbesondere in der frühen Heilungsphase 3–4 Wochen nach Fraktur.

Basierend auf der Definition von Wessler kann das ovariektomierte Tiermodell der Ratte für einen postmenopausalen Knochenverlust definiert werden, dessen Charakteristik dem des Knochenverlusts in postmenopausalen Frauen gleicht [31]. Die reduzierte systemische Östrogenkonzentration ist die einzige wichtige Ursache weshalb postmenopausale Frauen ein größeres Risiko des Knochenverlusts besitzen als prämenopausale Frauen.

Das 1. Tiermodell für einen postmenopausalen Knochenverlust wurde von Saville [39] beschrieben. Er konnte zeigen, dass die ovariektomierten Ratten einen geringeren relativen Knochen-Kalzium-Gehalt aufwiesen als die Kontrolltiere. Diese Ergebnisse wurden in mehreren Folgearbeiten bestätigt [38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47]. Die Wahl des Alters in dem die Ovariektomie erfolgen soll, wurde von den Autoren zwischen 3 Wochen [39] und 2 Jahren [48] gewählt.

Die histomorphometrische Analyse der proximalen Tibia wurde zur Evaluierung der Veränderungen der spongiösen Knochenstruktur nach Ovariektomie im reifen Rattenmodell bei einer Studie von Wronski et al. [38] herangezogen. Diese Studie hat gezeigt, dass in der Kontrollgruppe mit Ratten ohne Ovariektomie das Volumen im spongiösen Knochen für ungefähr 6 Monate nahezu konstant ist. Demgegenüber hatte die ovariektomierten Ratten einen dramatischen Verlust der Knochenmasse in der proxima-

len Tibia. Die Charakteristik des Knochenverlusts in der Ratte ist in vielen Aspekten denen des frühen Knochenverlusts bei postmenopausalen Frauen gleich [38, 40]. Der Anstieg im Knochenumbau mit einer zunehmenden Knochenresorption ist sowohl für ovariektomierte Ratten als auch für postmenopausale Frauen typisch [49]. Das reife ovariektomierte Rattenmodell ist einfach und reproduzierbar in der Umsetzung und zeigt die typischen charakteristischen Merkmale des menschlichen Individuums.

Wheeler et al. [50] zeigten in ihren Ergebnissen, dass der Frakturkallus bei normalen Ratten in der frühen Frakturheilung geringfügig bessere biomechanische Eigenschaften aufweist als bei ovariektomierten Tieren. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gefunden werden. Eine histomorphometrische Analyse erfolgte in dieser Studie nicht. Demgegenüber beschrieben Namkung-Matthai et al. [5] verminderte biomechanische Eigenschaften in den ovariektomierten Ratten 21 Tage nach Fraktur. Eine verminderte Frakturheilung im osteoporotischen Knochen wurde ebenfalls in der Studie von Walsh et al. [6] sowohl in der biomechanischen Prüfung als auch in der histologischen Analyse nachgewiesen. Die Ergebnisse dieser Studie konnten in der Mikro-CT-Auswertung eine verringerte Kallusbildung im osteoporotischen Knochen 4 Wochen postoperativ zeigen. In der Studie von Namkung-Matthai et al. [5] wurde die Kallusbildung nach Fraktur im osteoporotischen Knochen histomorphometrisch und histodynamisch beurteilt. Zu der verminderten Mineraldichte im neu geformten Kallus korrelierte gleichzeitig eine verringerte biomechanische Charakteristik.

Als Ursache für die verzögerte Kallusbildung im osteoporotischen Knochen wird die verringerte Konzentration von TGF-beta im osteoporotischen Knochen diskutiert [5, 9, 10, 11]. So war im kortikalen und spongiösen Knochen die Rate des Knochenumbaus sowohl bei der Alterung als auch in der Menopause mit einer Verminderung des TGF- β -Spiegels vergesellschaftet [9]. Eine Vermehrung von undifferenzierten mesenchymalen Gewebe und die Ausbildung dünnerer trabekulärer Strukturen im Frakturgebiet des osteoporotischen

Knochens fanden Walsh et al. [6] 10 Tage postoperativ; 3 Wochen nach Fraktur wiesen Namkung-Matthai et al. [5] eine Verzögerung der Zelldifferenzierung des Frakturkallus in ovariektomierten Ratten nach, wobei Walsh et al. [6] ein gleiches Ergebnis nach 4 Wochen zeigen konnte. Die Existenz von Chondrozyten im Frakturgebiet wurde in beiden Studien zu diesen Zeitpunkten ebenfalls beschrieben.

Auf der Grundlage der bereits gewonnenen Erkenntnisse, aus dem 1. Teil der präsentierten Arbeit und anderen Studien, sollte die Verbesserung der Knochenheilung im osteoporotischen Knochen durch eine zusätzliche lokale Therapie mit BMP4 untersucht werden. Durch die zellvermittelte Expression des BMP4 war eine kontinuierliche Proteinssekretion gewährleistet. Es konnte nachgewiesen werden, dass verminderte Knochenregeneration im osteoporotischen Knochen durch die Ex-vivo-Gentherapie verbessert werden konnte.

Die Ergebnisse aus dieser Studie haben die vorhandenen Kenntnisse über Veränderungen in der Knochenstruktur in ovariektomierten Ratten bestätigt. Die verzögerte Knochenheilung des osteoporotischen Knochens in der Frühphase ist durch eine verminderte Kallusbildung im Regenerationsgebiet charakterisiert. Dieses lässt sich auf eine verzögerte endochondrale Ossifikation zurückführen, welche sich am ehesten durch eine verminderte Konzentration von knochenspezifischen Wachstumshormonen im osteoporotischen Knochen erklären lässt. Die adäquate Substitution von BMP4 durch die Ex-vivo-Gentherapie vermag die endochondrale Ossifikation im osteoporotischen Knochen so zu verbessern, dass die Quantität des Kallus vergleichbar mit der im normalen Knochen ist.

Trotz der vielversprechenden Resultate in dieser Studie und in der Literatur ist eine kritische Betrachtung der Gentherapie unumgänglich. Die Auswirkungen auf den menschlichen Körper durch verändertes Genmaterial sowie durch die Verwendung einer viralen Transfektionsmethode können nicht sicher vorausgesagt werden. So führten bereits erste klinische Anwendungen der Gentherapie in einer Phase-I-Studie zum Tode zweier Patienten. Die Wissenschaftler haben eine enorme ethi-

sche Verantwortung gegenüber den Patienten bezüglich der Umsetzung neuer Therapieverfahren. Die leichtsinnige Handhabung und voreilige klinische Anwendung können zu tragischen Ergebnissen sowie zu einem Rückschritt in der wissenschaftlichen Entwicklung führen.

Fazit für die Praxis

Die Applikation von Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Knochenheilung ist für ein gezieltes Indikationsspektrum seit kurzer Zeit für die klinische Anwendung zugelassen. Die komplizierte Handhabung der Suspension, die kurze Halbwertszeit des Proteins in vivo sowie die hohen Herstellungskosten stellen jedoch entscheidende Limitationen für die standardisierte Umsetzung im klinischen Alltag dar. Die zellvermittelte Applikation von Wachstumshormonen durch die Ex-vivo-Gentherapie könnte eine Alternative zur einfachen Proteingabe in der Zukunft darstellen. Derzeit ist jedoch die klinische Anwendung der Gentherapie aufgrund der noch unklaren biologischen Wirkungsmechanismen in vivo nicht zu vertreten. Die 2 ungeklärten Todesfälle in jüngster Vergangenheit haben gezeigt, dass die Folgen der viralen Genmanipulation nicht abzuschätzen sind. Eine Auswirkung der Gentherapie auf den menschlichen Organismus kann weder mittelbar noch unmittelbar sicher vorausgesagt werden. Somit bleibt abzuwarten, ob durch weitergehende wissenschaftliche Untersuchungen diese Technik die notwendige Sicherheit und Effektivität erbringen kann, dass eine Anwendung im klinischen Alltag möglich ist.

Korrespondierender Autor

T. Rose

Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universität, Liebigstraße 20a, 04103 Leipzig
E-Mail: rost@medizin.uni-leipzig.de

Interessenkonflikt: Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

Hier steht eine Anzeige
This is an advertisement

 Springer

Literatur

1. Fowler BL, Dall BE, Rowe DE (1995) Complications associated with harvesting autogenous iliac bone graft. *Am J Orthop* 24 (12): 895–903
2. Enneking WF, Eady JL, Burchardt H (1980) Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. *J Bone Joint Surg Am* 62 (7): 1039–1058
3. Prokuski LJ, Marsh JL (1994) Segmental bone deficiency after acute trauma. The role of bone transport. *Orthop Clin North Am* 25 (4): 753–763
4. Josten C (1999) Segment transport. *Unfallchirurg* 102 (7): 513
5. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J et al. (2001) Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28 (1): 80–86
6. Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG (1997) Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop* 342: 218–227
7. Meyer RA, Jr, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiezbak GM (2001) Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res* 19 (3): 428–435
8. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J et al. (1999) Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68 (5–6): 197–202
9. Pfeilschifter J, Diel I, Scheppach B et al. (1998) Concentration of transforming growth factor beta in human bone tissue: relationship to age, menopause, bone turnover, and bone volume. *J Bone Miner Res* 13 (4): 716–730
10. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H (1994) Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 65 (1): 37–41
11. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS et al. (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13 (3): 357–367
12. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150 (698): 893–899
13. Takagi K, Urist MR (1982) The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop* 171: 224–231
14. Sandhu HS, Kanim LE, Kobo JM et al. (1996) Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion. *Spine* 21 (18): 2115–222
15. Mundy GR (1996) Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 324: 24–28
16. Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D et al. (2001) Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am* 83 (7): 1032–1039
17. Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S et al. (1999) The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am* 81 (7): 905–917
18. Wang JC, Kanim LE, Yoo S, Campbell PA, Berk AJ, Lieberman JR (2003) Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats. *J Bone Joint Surg Am* 85 (5): 905–911
19. Rundle CH, Miyakoshi N, Kasukawa Y et al. (2003) In vivo bone formation in fracture repair induced by direct retroviral-based gene therapy with bone morphogenetic protein-4. *Bone* 32 (6): 591–601
20. Park J, Ries J, Gelse K, Kloss F, von der Mark K, Wiltfang J, Neukam FW, Schneider H (2003) Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Ther* 10 (13): 1089–1098
21. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hedrick MH, Benhaim P (2003) Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21 (4): 622–629
22. Chen Y, Luk KD, Cheung KM, Xu R, Lin MC, Lu WW, Leong JC, Kung HF (2003) Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther* 10 (16): 1345–1353
23. Young BH, Peng H, Huard J (2002) Muscle-based gene therapy and tissue engineering to improve bone healing. *Clin Orthop* 403 [Suppl]: 243–251
24. Werntz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E (1996) Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res* 14 (1): 85–93
25. Musgrave DS, Bosch P, Lee JY et al. (2000) Ex vivo gene therapy to produce bone using different cell types. *Clin Orthop* 378: 290–305
26. Bosch P, Musgrave DS, Lee JY et al. (2000) Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res* 18 (6): 933–944
27. Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, Rutherford RB (2000) Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther* 11 (8): 1201–1210
28. Peng H, Wright V, Usas A, Gearhart B, Shen HC, Cummins J, Huard J (2002) Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *J Clin Invest* 110 (6): 751–759
29. Wright V, Peng H, Usas A, Young B, Gearhart B, Cummins J, Huard J (2002) BMP4-expressing muscle-derived stem cells differentiate into osteogenic lineage and improve bone healing in immunocompetent mice. *Mol Ther* 6 (2): 169
30. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J (1998) Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol* 142 (5): 1257–1267
31. Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15 (3): 175–191
32. Hildebrand T, Rueggsegger P (1997) Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1 (1): 15–23
33. Boden SD, Martin GJ Jr, Horton WC, Truss TL, Sandhu HS (1998) Laparoscopic anterior spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a titanium interbody threaded cage. *J Spinal Disord* 11 (2): 95–101
34. Hecht BP, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Penman L, Toth JM, Shirkhoda A (1999) The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model. *Spine* 24 (7): 629–636
35. Boden SD, Martin GJ Jr, Morone MA, Ugbo JL, Moskowitz PA (1999) Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine* 24 (12): 1179–1185
36. Gazit D, Turgeman G, Kelley P, Wang E, Jalenak M, Zilberman Y, Moutsatsos I (1999) Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J Gene Med* 1 (2): 121–133
37. Reddi AH, Cunningham NS (1993) Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res* 8 [Suppl 2]: 499–502
38. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M (1989) Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45 (6): 360–366
39. Saville PD (1969) Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc* 17 (2): 155–166
40. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW (1989) The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124 (1): 7–16
41. Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB (1972) Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of oestrogen and/or progesterone replacement therapy in its prevention. *J Endocrinol* 55 (1): 79–87
42. Hodgkinson A, Aaron JE, Horsman A, McLachlan MS, Nrodin BE (1978) Effect of oophorectomy and calcium deprivation on bone mass in the rat. *Clin Sci Mol Med* 54 (4): 439–446
43. Lindsay R, Aitken JM, Hart DM, Purdie D (1978) The effect of ovarian sex steroids on bone mineral status in the oophorectomized rat and in the human. *Postgrad Med J* 54 [Suppl 2]: 50–58
44. Blanusa M, Matkovic V, Kostial K (1978) Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. II. Influence of ovariectomy and dietary calcium. *Pflugers Arch* 375 (3): 239–244
45. Kimmel DB, Wronski TJ (1990) Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 46 (2): 101–110
46. Jee WS, Mori S, Li XJ, Chan S (1990) Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone* 11 (4): 253–266
47. Mori S, Jee WS, Li XJ, Chan S, Kimmel DB (1990) Effects of prostaglandin E2 on production of new cancellous bone in the axial skeleton of ovariectomized rats. *Bone* 11 (2): 103–113
48. Ibbotson K, Orcutt C, D'Souza S, Miller B, Stokes C, Jankowsky M, Boyce R (1989) Contrasting effects of parathyroid hormone (PTH) and human recombinant insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and bone in an aged ovariectomized (OVX) rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 4 [Suppl 1]: 377
49. Liu CC, Kalu DN (1990) Human parathyroid hormone-(1–34) prevents bone loss and augments bone formation in sexually mature ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 5 (9): 973–982
50. Wheeler DL, Eschbach EJ, Montfort MJ, Maheshwari P, McLoughlin SW (2000) Mechanical strength of fracture callus in osteopenic bone at different phases of healing. *J Orthop Trauma* 14 (2): 86–92