

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Verwendung von fetalen Mäusezellen

Die Calvarienzellen wurden aus Schädelkalotten von 18 Tage alten Mäuseembryonen isoliert, die Epiphysenzellen aus den großen Gelenken der Tiere. Die Gewinnung der Zellen erfolgte enzymatisch unter anderem mit Collagenase, dies ermöglicht die Isolierung von Osteoblasten bzw. Chondroblasten (Freshney, 1990). Mit den so gewonnenen Zellen konnten differenzierungsfähige Primärzellkulturen angelegt werden. Bei diesen sind spezialisierte Zellfunktionen besonders ausgeprägt, da eine morphologische Ähnlichkeit mit dem Ursprungsgewebe besteht (Zimmermann et al., 1988 und 1990; Freshney, 1990).

Im Prozess der Differenzierung entwickeln sich Vorläuferzellen zu Zellen mit bestimmten funktionellen und phänotypischen Eigenschaften, z.B. Osteoblasten und Chondroblasten. Diese können in der Kultur Matrix bilden und zu reifen Zellen differenzieren und mineralisieren. Mit zunehmender Differenzierung nimmt die Proliferationsrate von Zellen ab, in der Endphase der Differenzierung findet man nur noch wenige Zellteilungen (Freshney, 1990).

Im Hinblick auf das Mineralisationspotenzial ist die Zellisolierung aus fetalem oder jungem Gewebe von Vorteil, denn in Experimenten zeigte sich eine altersabhängige Abnahme der Differenzierungsfähigkeit von Zellen (Van den Bos und Beertsen, 1999). Mit zunehmendem Alter der Gewebe wird es schwieriger, lebensfähige und proliferierende Zellen zu erhalten, da die Differenzierung fortgeschritten ist, der Anteil an Bindegewebe zunimmt und die Zahl der undifferenzierten Zellen reduziert ist (Marie, 1995; De Pollak et al., 1997).

Die Kulturen aus fetalen Mäusezellen enthalten determinierte Vorläuferzellen und wenige differenzierte Zellen. Aufgrund ihres niedrigen Differenzierungsgrads besitzen sie ein

hohes Potenzial zur Differenzierung, Matrixbildung und zur Bildung von Mineralisationsherden.

Zur Untersuchung der induzierten osteogenen Differenzierung stellen insbesondere die Zellen aus Mäusecalvarien ein erprobtes und verlässliches Modell dar (Ecarot-Carrier et al., 1983; Nefussi et al., 1985; Zimmermann et al., 1991), aber auch die enchondrale Mineralisation in fetalen Mäuseepiphysenkulturen wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Zimmermann et al., 1990 und 1992). Ein Nachteil beim Einsatz von in-vitro-Kulturen ist stets die Frage der Vergleichbarkeit mit der in vivo Situation im Menschen.

5.1.2 Einsatz der Organoidkultur

1928 entwickelte Fell eine Technik, mit der sie mit Hilfe von Explantaten aus Tibiae von Hühnerembryonen erstmals Knochen und Knorpel produzieren konnte (Fell, 1928). Die Idee der Organkultur, in der Zellen in vitro vergleichbar zu einer in vivo Situation wachsen können, ist mindestens 40 Jahre alt (Fell und Robinson, 1965), wurde im Lauf der Zeit aber verbessert und vereinfacht. 1970 wurden erstmalig sterile Kunststoffkulturschälchen und Metallgrids verwendet (Lewis und Irving, 1970).

In der Organoidkultur können sich die Zellen durch die hohe Zelldichte und durch die Trennung vom Medium mittels des Zellulosenitratfilters ihr eigenes Mikromilieu schaffen. So können parakrin und autokrin agierende Zellprodukte in der Kultur verbleiben und werden nicht in das Medium abtransportiert oder durch Medium verdünnt. Die Zellen können in der Organoidkultur differenzieren und dabei histotypische Strukturen und zelltypisches Verhalten ausbilden (Zimmermann et al., 1988; 1991 und 1992).

In mehreren in vitro Studien konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten und Chondroblasten, die in hoher Zelldichte wachsen, eine Mineralisation und Differenzierung erreichen, die gut mit einer Situation in vivo zu vergleichen ist (Merker et al., 1980; Cottrill et al., 1987; Zimmermann et al., 1988).

Die Organoidkultur ist daher geeignet zur Untersuchung von verschiedenen Effekten auf die Osteogenese und Mineralisation.

Durch die Präparationsmethode ist es unvermeidbar, dass sich in den Calvarienkulturen auch Chondroblasten aus den Schädelsuturen in variabler Anzahl befinden können. In den Epiphysenkulturen ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass sich hier auch Osteozyten befinden. Die unterschiedlichen Mineralisationsmechanismen der beiden Kulturen werden dadurch aber nicht wesentlich beeinflusst, doch können differente Effekte, jeweils auf dem einen oder anderen Zelltyp beruhend, nicht ausgeschlossen werden.

Eine Mineralisation *in vitro* wird erst durch einen Phosphatdonor im Medium möglich (Nefussi et al., 1985; Bellows et al., 1986; Zimmermann et al., 1988). In dieser Arbeit wurde Natrium- β -Glycerophosphat (β -GP) zu diesem Zweck eingesetzt. Das Enzym Alkalische Phosphatase spaltet die Phosphatgruppe ab und diese verbindet sich unter Vermittlung kollagener Fibrillen mit Calcium zu Hydroxylapatit (Bellows et al., 1991). Eine weitere Voraussetzung für die Mineralisation ist die Zugabe von Vitamin C zum Nährmedium. Durch das Vitamin C wird die Hydroxylierung von Kollagen stimuliert und somit steht ausreichend kollagene Matrix für die Mineralisation zur Verfügung (Bellows et al., 1986; Zimmermann et al., 1992).

Diese experimentelle Arbeit nahm nahezu 14 Monate in Anspruch. Die absoluten Messergebnisse variierten zum Teil stark von Versuch zu Versuch.

Dies lässt sich auch auf die Fehlerquellen bei der technischen Herstellung der Organoidkulturen zurückführen, die selbst bei sehr sorgfältiger Arbeit nie vollständig auszumergen sind. Aus der gewonnenen Zellsuspension wurden mit einer Pipette die Tropfen für die Organoidkultur auf den Zellulosenitratfilter aufgebracht. Jeder Tropfen birgt jedoch, auch durch Inhomogenitäten in der Zellsuspension, geringfügig unterschiedliche Volumina an Zellmasse.

5.1.3 Anwendung der Hyperbaren Sauerstofftherapie

Für die Anwendung von hyperbarem Sauerstoff in einer *in vitro* Situation benötigt man einen luftdicht abgeschlossenen Hohlraum, der es ermöglicht, bei einer unveränderten Temperatur von 37°C die definierte Sauerstoffkonzentration und den erwünschten Druck zu halten. In der Literatur sind zu diesem Zweck mehrere Modelle beschrieben worden:

- Gray et al. (1976 und 1978) verwendeten in ihren Versuchen versiegelte Töpfe, die zunächst mit der benötigten Gasmischung gespült wurden,
- Dahlin et al. (1993) sowie Roberts und Harding (1994) führten ihre in vitro Versuche in kleineren hyperbaren Druckkammern, wie sie auch für in vivo Anwendungen zur Verfügung stehen, durch,
- Domm et al. (2000) und Hansen et al. (2001) ließen für ihre Versuche eigene kombinierte Druck/Sauerstoff-Zellkulturkammern entwickeln und konstruieren.

Die Verwendung eines Schnellkochtopfes stellt eine einfache und leicht zu handhabende Möglichkeit zur Versuchsdurchführung dar. Dadurch, dass der Topf stets mit inkubiert wurde (auch außerhalb der Versuchsphasen), kam es zu keinem wesentlichen Temperaturabfall. Die Dichtigkeit des Topfes wurde vor jedem Versuch erneut überprüft.

Ein Nachteil beim Einsatz eines handelsüblichen Schnellkochtopfes ist, dass man durch ein ausführliches „Spülen“ des Topfes mit der Sauerstoffmischung zwar die gewünschte Sauerstoffkonzentration im Topf erhält (Gray und Hamblen, 1976; Gray et al., 1978), die tatsächliche Sauerstoffkonzentration im Topfinneren aber nicht kontrolliert werden kann.

5.1.4 Messung von Calcium und Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Eine Mineralisierung als Ausdruck der Differenzierung kann in Zellkulturen durch die Messung von Calcium und der Aktivität von Alkalischer Phosphatase quantifiziert werden. Durch die Zugabe von β -Glycerophosphat wird die Mineralisierung initiiert, sie ist der erste Schritt in der Knochenentwicklung (Zimmermann et al., 1992).

Die Calciuminkorporation in die Kulturen ist abhängig von der Menge des zugefügten β -Glycerophosphates. Durch die ALP wird die Phosphatgruppe des β -GP abgespalten. Calcium bindet mit Vermittlung von kollagenen Fibrillen dieses Phosphat, das Ergebnis ist Hydroxylapatit (Bellows et al., 1991). Wenn man die Aktivität der Alkalischen Phosphatase vollkommen hemmt, so wird auch der Calciumgehalt in den Kulturen gesenkt und die Mineralisation fast vollständig verhindert (Zimmermann et al., 1992).

Um eine Aussage über die verschiedenen Grade der Mineralisation in den Versuchsreihen treffen zu können, wurden Calcium und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als geeignete Messparameter ausgewählt. Sie sind zwei völlig hinreichende Parameter, um die Osteoblasten- bzw. Chondroblastendifferenzierung abzuschätzen (Penttinen, 1972; Gray und Hamblen, 1976; Zimmermann et al., 1992; Tuncay et al., 1994).

5.2 Fetale Mäusecalvarienzellen

Mit der Verwendung von fetalen Mäusecalvarienzellen sollte der Einfluss von HBO, 95% Sauerstoff und Druck von 2 bar (1500 mmHg) auf die Mineralisation im Rahmen der desmalen Ossifikation geprüft werden.

5.2.1 Wirkung von Sauerstoff auf fetale Mäusecalvarienzellen

Einer der wichtigsten Faktoren, der die Differenzierung und das Verhalten von Knochenzellen kontrolliert, ist die Veränderung des lokalen Sauerstoffdrucks (Hall, 1970; Gray und Hamblen, 1976). Nach Untersuchungen von Bassett und Herrmann (1961) kann die Sauerstoffversorgung einer Zellkultur auch den Zelltyp verändern, zu dem sich eine pluripotente Stammzelle im Mesenchym entwickelt. Hyperoxie führt zur Differenzierung von Osteoblasten und Osteozyten, Hypoxie zu Chondroblasten und Chondrozyten (Basset und Herrmann, 1961; Niinikoski und Hunt, 1972). Auch im Laufe der Differenzierung können sich die Gewebe in Folge von äußeren Einflüssen noch verändern. So kann sich durch eine schlechtere Sauerstoffversorgung im Knochengewebe auch wieder Knorpel entwickeln (Hall, 1970).

Dass unter in vitro Bedingungen eine Hyperoxie die Knochensynthese erhöht und somit auch die Mineralisation beschleunigt, wurde bereits mehrfach bewiesen (Basset und Herrmann, 1961; Shaw und Bassett, 1967; Prasad und Reynolds, 1968; Lewis und Irving, 1970). Durch ein größeres Sauerstoffangebot kann vermehrt Kollagen synthetisiert werden, somit steht Matrix zur Mineralisation zur Verfügung.

Die Kollagensynthese benötigt für den Einbau der einzelnen Aminosäuren eine Vielzahl von ATP-Molekülen, die nur beim aeroben Stoffwechsel zur Verfügung gestellt werden

können (Miwa et al., 1990; Sawai et al., 1996). Andererseits wird unter Hypoxie die Knochenheilung durch Verminderung von Kollagensynthese und Mineralisation retardiert (Shaw und Bassett, 1967; Niinikoski und Hunt, 1972).

Die atmosphärische Sauerstoffkonzentration, unter der man bisher die intensivste Osteogenese und Mineralisation in einer Kultur nachweisen konnte, liegt bei 35% in Kulturen von embryonalen Hühnertibiae. Kaum noch Knochenbildung oder Kalzifizierung fand sich bei 5% Sauerstoff. Bei einer Atmosphäre von 95% Sauerstoff war die Mineralisierung geringer als bei 35% Sauerstoff, jedoch im Vergleich zur Kontrolle deutlich verstärkt (Shaw und Bassett, 1967).

In der vorliegenden Untersuchung konnte die mineralisationsfördernde Wirkung von Hyperoxie auch in der Organoidkultur bestätigt werden. Eine längerfristige Behandlung der Zellen mit 95% Sauerstoff für eine Stunde am Tag und über 7 oder 8 Tage führte sowohl beim Einbau von Calcium in die Kulturen, als auch bei der Aktivitätssteigerung der Alkalischen Phosphatase zu hoch signifikanten Steigerungen. Die Aktivität der ALP wurde bereits nach 5 Behandlungstagen hoch signifikant gesteigert.

4 Tage nach Abschluss der Behandlung waren die Messunterschiede im Vergleich zu den Kontrollkulturen weiterhin hoch signifikant und zwar sowohl den Calciumeinbau als auch die Aktivität der ALP betreffend (s. Abbildung 7 und Abbildung 8).

Um jedoch einen positiven Effekt erzielen zu können, ist eine wiederholte Anwendung mit Sauerstoff notwendig. Eine einmalige Sauerstoffbehandlung hatte zu einer hoch signifikanten Verminderung des Calciumeinbaus in die Zellen geführt, bei gleicher Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Bezug auf die Kontrolle. Behandlungszeiträume von 3 und 5 Tagen konnten beim Calciumeinbau zu keinen entscheidenden Änderungen bzw. signifikanten Steigerungen führen, ebenso verhielt sich die Aktivität der ALP bei einer dreitägigen Behandlung (s. Abbildung 9 und Abbildung 11).

Die Ergebnisse der Untersuchung entsprachen auch Resultaten von Tuncay et al., der mit Osteoblastenkulturen von embryonalen Rattencalvarien gearbeitet hatte. Die Zellen, die in einer Atmosphäre mit 90% Sauerstoff gewachsen waren, zeigten keine verstärkte Zellproliferation, wohl aber eine erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase und eine verstärkte Kollagensynthese. Genau umgekehrt waren die Ergebnisse bei Wachstum

der Osteoblastenkulturen bei nur 10% Sauerstoff in der Atmosphäre. Die Sauerstoffzufuhr war hier jedoch kontinuierlich und nicht intermittierend erfolgt (Tuncay et al., 1994). Eine zu lang andauernde Behandlung mit Sauerstoff kann sich auch negativ auf die Zellen auswirken. In einer von Gray und Hamblen im Jahre 1976 durchgeführten Studie wirkte sich eine Inkubation von 48 Stunden in einer Atmosphäre von 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid toxisch auf die Syntheseleistung und die Resorptionsaktivität in Calvarienzellkulturen aus (Gray und Hamblen, 1976).

Eine kontinuierliche Behandlung mit Hyperoxie kann sich demnach sowohl positiv als auch negativ auf Zellwachstum und Mineralisation von Knochenzellkulturen auswirken. Unter dem Einfluss von Sauerstoff können Sauerstoffradikale entstehen, die zu Zellschäden führen können (siehe auch Kap. 1.8.3; Gutteridge, 1994; Rothfuss et al., 1998). Dass Reparaturmechanismen und ein oxidativer Schutz der Zelle wirksam werden, kann eine Begründung für die Beobachtung sein, dass:

- eine einmalige Behandlung der Zellen mit Sauerstoff zu einer verminderten Mineralisation führt
- und deutlich machen, dass die Mineralisation, die durch den Sauerstoff eigentlich unterstützt wird, ebenso wie die Zellteilung zunächst nur begrenzt stattfindet.

Dies kann auch erklären, warum in der vorliegenden Untersuchung eine eintägige Behandlung mit Sauerstoff zu einer hoch signifikanten Reduktion im Calciumeinbau geführt hat und erst mit den folgenden Behandlungen eine Adaptation an den oxidativen Stress stattfand.

In vivo herrscht im Knochen ein relativ hoher Sauerstoffdruck von ca. 90-110 mmHg (gemessen in Fibuladiaphysen narkotisierter Hasen) (Brighton und Krebs, 1972).

Bei der Knochenheilung ist der Sauerstoffdruck im Frakturhämatom mit ca. 6 mmHg zunächst sehr niedrig, im Lauf der Kallusbildung steigt er jedoch an. Ab dem 14. Tag nach der Fraktur lässt sich Knochengewebe mit einem Sauerstoffdruck von ca. 28 mmHg nachweisen. In den folgenden 3 Wochen steigt der Sauerstoffdruck mit dem Knochenwachstum kontinuierlich an, bis er normale Werte (90-110 mmHg) erreicht (Brighton und Krebs, 1972).

Es stellt sich die Frage, ob der zunächst niedrige Sauerstoffdruck im heilenden Knochen an einem erhöhten Sauerstoffbedarf der Zellen, an einem zunächst verminderten

Sauerstofftransport zu den Zellen - durch die auch noch nicht abgeschlossene Neoangiogenese - oder an einer Kombination von beiden Möglichkeiten liegt.

Versuchsreihen zeigen, dass in den ersten 21 Tagen der Heilung die Konzentrationen an DNS und RNS im Rattenkallus höher sind, als im normalen Knochen (Penttinen, 1972). Diese Feststellung spricht für einen erhöhten Sauerstoffbedarf bei der Knochenbildung und Mineralisation (durch die sauerstoffverbrauchende Zellbildung).

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung lässt sich diese Frage zwar auch nicht endgültig klären, die Resultate verdeutlichen aber, dass die Mineralisation ein Vorgang ist, der Sauerstoff benötigt und dass eine verstärkte Mineralisation unter erhöhter Zufuhr von Sauerstoff stattfindet.

5.2.2 Wirkung von Druck auf fetale Mäusecalvarienzellen

Als mechanische Stimuli wirken auf Zellen sowohl Druck- als auch Zugkräfte. Zugkräfte können sich sehr unterschiedlich auf Knochenkulturen auswirken. Dabei ist in erster Linie ihre Stärke wichtig. Ein geringer Zug kann die Osteogenese fördern, ein starker Zug vollkommen verhindern (Hall, 1970; vgl. Kap. 5.3.2).

Intermittierender Druck und Zug kann in vitro deutliche Steigerungen der Osteogenese und Mineralisation bewirken (Shaw und Bassett, 1967). Durch intermittierenden Druck auf Knochenstanzzyylinder von Hundefemora konnte eine signifikante Zunahme der Gesamt-RNA in den Zellen nachgewiesen werden, sowie eine erhöhte Aufnahme von Uridin. Dies weist auf eine verstärkte Matrixsynthese durch einen mechanischen Stimulus hin (el Haj et al., 1990). Er bewirkt die Generierung eines elektrischen Potentials an den Zellmembranen und kann sich somit auch auf die Kollagenbildung in den Osteozyten auswirken. Adaptieren sich jedoch die Zellen an einen ständigen (und nicht mehr intermittierend ausgeübten) Druck, kann statt Knochen auch Knorpelgewebe produziert werden (Hall, 1970).

Zusätzlich führen mechanische Stimuli am Knochen zu einer Veränderung im Fluss der Extrazellulärflüssigkeit und der Interstitialflüssigkeit, auch dies verändert Membranprozesse der Osteozyten. Im Rahmen dieser Flüssigkeitsverschiebungen konnte eine er-

höhte Knochenproduktion mit Mineralisation beobachtet werden, vermutlich durch einen erhöhten Transport von Nährstoffen zu den Zellen und einen verstärkten Abtransport von Abfallprodukten der Zellen. Bei einem kontinuierlich ausgeübten Druck wird die Extrazellulärflüssigkeit nicht im gleichen Maße verschoben und es resultiert auch keine erhöhte Osteogenese, dies ist auch bei vermindertem oder fehlendem mechanischem Stress zu beobachten (Basso und Heersche, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass Behandlungen mit Druck von täglich einer Stunde bei 2 bar bereits ab dem ersten Behandlungstag eine zum Teil hoch signifikante fördernde Wirkung auf die Mineralisation haben. Dieser Effekt lässt sich ebenfalls hoch signifikant noch 4 Tage nach Beendigung einer achttägigen Behandlung darstellen und zwar sowohl im Einbau von Calcium als auch bei der Aktivitätssteigerung der Alkalischen Phosphatase (s. Abbildung 7 und Abbildung 8).

Die Behandlung der Kulturen mit Druck führt beim Einbau von Calcium bereits nach einem Tag zu hoch signifikanten Werten, ebenfalls nach 5 und nach 7 Behandlungstagen. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird erst nach 3 Behandlungstagen zum Teil hoch signifikant gesteigert (s. Abbildung 9 und Abbildung 11).

Dies zeigt, dass ein einmaliger Stimulus auf die Zellen bereits zu Veränderungen in der Mineralisation führen kann, erst die wiederholte Stimulation durch Druck jedoch die Mineralisation ausgeprägt und auch dauerhaft fördert. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung decken sich mit der aus der Literatur bekannten fördernden Wirkung von intermittierendem Druck auf die Osteogenese und Mineralisation *in vitro*.

In vivo kann ein erhöhter Druck die Kompression von Blutgefäßen bewirken. Durch die somit bedingte Hypoxie und Minderversorgung der Skelettabschnitte wurden im Tierversuch Knorpelbildungen im Knochen beschrieben, die als Zeichen der verminderten Sauerstoffversorgung gedeutet wurden (Hall, 1970). Daher lassen Ergebnisse von *in vivo*-Untersuchungen, bei denen Druck auf isolierte Skelettabschnitte ausgeübt wurde, keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu. Zusätzlich lassen sich *in vivo* auch keine isolierten Ereignisse betrachten. Trotzdem ist aus der Anatomie und der klinischen Pathologie bekannt, dass besondere mechanische Belastungen zu einer Umstrukturierung im Knochen und auch zu einer Verstärkung von Knochengewebe in Richtung der Hauptbelastung führen.

Ein verminderter Druck von nur 0,5 atm (= 380 mmHg) führte bei der Frakturheilung von Rattentibiae zu einer verminderten Kallusbildung mit einer niedrigeren Zugfestigkeit des Kallusgewebes und auch zu deutlich geringeren Mineralienanteilen, v.a. zu einer geringeren Kalzifikation. Zudem ließen sich verminderte DNS- und RNS-Konzentrationen messen, sowie eine deutlich verminderte Mineralisation im Vergleich zur Heilung und Kallusentwicklung bei normalem Umgebungsdruck feststellen (Penttinen, 1972).

Aus Anatomie und klinischer Erfahrung ist bekannt, wie sich verstärkte Belastungen auf das Skelett auswirken, bzw. wie auch eine Immobilisation sich auf die Knochensubstanz auswirkt. Insofern überrascht es nicht, dass auch in der Zellkultur rezidivierende Druckphasen zu einer Förderung der Mineralisation führen. In der vorliegenden Untersuchung konnte dieses Wissen bestätigt werden.

5.2.3 Wirkung von HBO auf fetale Mäusecalvarienzellen

In einer von Gray und Hamblen im Jahre 1976 durchgeführten in vitro Studie mit Mäusecalvariarien führte eine ununterbrochene HBO-Behandlung über 48 Stunden bei 98% Sauerstoff zu einer Nekrose der meisten Calvariarienzellen und zu Kernpyknosen (Gray und Hamblen, 1976). Auch in vivo führt eine tägliche HBO-Behandlung über 6 Stunden bei Ratten zu einer deutlich verschlechterten Frakturheilung (Wray und Rogers, 1968).

Erst eine intermittierende Behandlung mit HBO (2 mal täglich 2 Stunden) konnte im Tierversuch bei Ratten mit frakturierten Tibiae eine deutliche Zunahme an Kallus mit erhöhten Werten an Calcium und Kollagenanteilen nachweisen. Diese Effekte wurden ab dem 11. Behandlungstag signifikant (Niinikoski et al., 1970).

Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Yablon und Cruess, diese führten eine HBO-Behandlung 2 mal täglich für nur jeweils eine Stunde und zwar sowohl bei einem bar (= 750 mmHg) als auch bei 3 bar (= 2250 mmHg) Druck durch. In diesem Versuchsaufbau konnte der verstärkt gebildete Kallus von frakturierten Rattenfemora unter HBO schneller in Knochen umgebaut werden. Die verstärkte Mineralisation wurde in der Behandlungsgruppe ab dem 15. Tag HBO deutlich (Yablon und Cruess, 1968). Zusätzlich wiesen mit HBO behandelte Frakturen höhere Bruchfestigkeiten auf (Coulson et al., 1966).

Gute Ergebnisse erzielte die intermittierende hyperbare Oxygenation im Versuch mit Ratten auch auf die chemische Kalluszusammensetzung. Im zusätzlich vermehrten Kallus ergab sich vor allem eine Akkumulation von Calcium, aber auch von Magnesium, Phosphor, Natrium, Kalium, Zink, Kollagen und weiteren Proteinen (Coulson et al., 1966; Niinikoski et al., 1970; Penttinen, 1972).

In in vivo Versuchen konnte auch bei Hasen durch HBO-Behandlungen die Knochenheilung beschleunigt werden. Zurückführen lässt sich dies auf die erhöhte Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten, eine schnellere Bildung von Osteoid mit nachfolgender Mineralisation und durch eine Beeinflussung der Differenzierung von Osteoblasten aus Vorläuferzellen (Sawai et al., 1996).

In der therapeutischen Anwendung von HBO am Menschen wird eine beschleunigte Wund- und Knochenheilung oder das Zustandekommen einer Wundheilung im Rahmen einer Osteomyelitis oder Osteoradionekrose lediglich auf die Neovaskularisation der Gewebe zurückgeführt (Marx, 1983; Marx und Johnson, 1987; Lambert et al., 1997; Thorn et al., 1997). Dies beruht vermutlich auch auf einer weitgehenden Ermangelung von histologischen oder biochemischen Untersuchungen der Wundheilungszonen im Knochen und der Osteolysen.

In der vorliegenden Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass die Bestandteile der HBO, nämlich Sauerstoff und Druck, sich einzeln positiv auf die Mineralisation von Knochenkulturen auswirken. Bei Anwendung der HBO mit beiden Bestandteilen gemeinsam (Druck und Sauerstoff) wird die Mineralisation verstärkt.

Dieser Einfluss zeigt sich signifikant im Calciumeinbau in die Kulturen nach 8 Tagen HBO und hoch signifikant in der Aktivitätssteigerung der Alkalischen Phosphatase. 4 Tage nach Abschluss einer achttägigen HBO-Behandlung waren sowohl die Ergebnisse im Calciumeinbau als auch in der Aktivitätsmessung der ALP hoch signifikant (s. Abbildung 7 und Abbildung 8).

Im Mittel lässt sich diese Verstärkung der Mineralisation erst nach Behandlungsphasen von mindestens 5 Tagen nachweisen und insgesamt auch weniger ausgeprägt als mit einer alleinigen Sauerstoffbehandlung. Kürzere Behandlungen von nur einem Tag oder auch 3 Tagen führten in den Versuchen zu einem verminderten Calciumeinbau und

auch zu einer verminderten Aktivität der Alkalischen Phosphatase (s. Abbildung 9 und Abbildung 11). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der alleinigen Behandlung mit Sauerstoff. Auch hier kommt vermutlich zunächst wieder eine Schädigung der Zellen durch den potenziell toxischen Sauerstoff zum Tragen, bevor von ihnen eine ausreichende oxidative Abwehr gebildet werden kann (s. Kap. 1.8.3; Gutteridge, 1994; Rothfuss et al., 1998).

Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben in der Literatur, in der ebenfalls positive Einflüsse von HBO auf die Mineralisation von Knochenkulturen beschrieben wurden. Die veröffentlichten Ergebnisse zeigten jedoch erst später signifikante Verbesserungen der Mineralisierung, frühestens ab dem 11. Behandlungstag (Niinikoski et al., 1970). Auch in der klinischen Anwendung von HBO bei Osteoradionekrose oder Osteomyeliten werden mindestens 30 Behandlungstage angewendet, nach der UHMS erfolgt eine klinische Reevaluierung erst nach 40 Behandlungen (Lambert et al., 1997; Larsen, 1997, UHMS, 2003).

Histologische Veränderungen ohne den Nachweis einer Signifikanz, aber zugunsten einer geförderten Mineralisation unter HBO wurden nach 7 Behandlungstagen im Tierversuch mit Hasen nachgewiesen (Sawai et al., 1996).

5.3 Fetale Mäuseepiphysenzellen

Durch den Einsatz von fetalen Mäuseepiphysenzellen sollte der Einfluss von HBO, 95% Sauerstoff und Druck von 2 bar (1500 mmHg) auf die Mineralisation im Rahmen der enchondralen Kalzifizierung geprüft werden.

5.3.1 Wirkung von Sauerstoff auf fetale Mäuseepiphysenzellen

Chondrozyten verbrauchen nur wenig Sauerstoff. Sie erzeugen kaum ATP über die mitochondriale oxidative Phosphorylierung, sondern betreiben hauptsächlich Glykolyse ohne Sauerstoffverbrauch und mit Produktion von Laktat (Lane et al., 1977; Shapiro et al., 1997; Lee und Urban, 2002). Durch eine mehrtägige Kultivierung in sauerstoffreicher Atmosphäre kann in Kulturen von Gelenkknorpelzellen jedoch ein oxidativer Meta-

bolismus induziert werden und es findet ein Wechsel zwischen den beiden Arten der Energiegewinnung statt (Lane et al., 1977; Johnson et al., 2000).

Im Knorpelgewebe selbst herrscht abhängig vom Ort der Messung (gelenknah – gelenkfern, in oberen Gewebeschichten oder in tieferen Knorpellagen) ein relativ niedriger Sauerstoffdruck von ca. 20-40 mmHg (Brighton und Heppenstall, 1971). Im Rahmen der Kallusbildung zur Frakturheilung wird in den ersten 14 Tagen nach der Fraktur ein knorpeliger Kallus angelegt. Während dieser Zeit wird der Sauerstoffdruck im Kallusgewebe von Ratten kontinuierlich mit 30-40 mmHg gemessen (Brighton und Krebs, 1972). Auffällig ist ein zunächst niedriger Sauerstoffdruck im Frakturgewebe, sowohl im Frakturhämatom mit nur ca. 6 mmHg, als auch im sich danach bildenden knorpeligen Kallus mit 30-40 mmHg. Möglicherweise sind diese niedrigen Sauerstoffdrücke ein Stimulus für ruhende pluripotente Zellen um zu Chondroblasten zu differenzieren, andererseits kann der niedrige Sauerstoffdruck auch mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch der Zellen zusammenhängen (Brighton und Krebs, 1972).

Die Mineralisation des knorpeligen Kallus findet verstärkt in den ersten 2 Wochen nach der Fraktur statt. Danach nimmt die Mineralisationsrate ab und gleicht sich der im intakten Knochen an. In diesen 14 Tagen kann man auch die höchsten Werte an Laktat messen. Es weist als Produkt der anaeroben Glykolyse auf einen maximalen Energieverbrauch der an der enchondralen Mineralisation beteiligten Knorpelzellen in dieser Zeit hin (Penttinen, 1972).

In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die alleinige Behandlung der Chondrozytenkulturen mit Sauerstoff eine signifikante Verstärkung der Mineralisation in den Kulturen gemessen werden. Der Einbau von Calcium konnte durch eine 5-, 7- und achttägige Behandlung gering, aber signifikant gesteigert werden. Auch 4 Tage nach Beendigung der achttägigen Behandlung war der Calciumeinbau noch gering, aber weiterhin signifikant gesteigert (s. Abbildung 13 und Abbildung 16). Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch Behandlungen über 3, 5 und 7 Tage hoch signifikant gesteigert. Eine Behandlung über 8 Tage zeigte ebenfalls eine signifikante Aktivitätssteigerung, diese ließ sich jedoch 4 Tage nach Behandlungsende nicht mehr signifikant nachweisen (s. Abbildung 14 und Abbildung 17).

Auffällig ist, dass eine einmalige Behandlung mit Sauerstoff bei 2 bar sowohl zu einer Reduktion im Calciumeinbau, als auch zu einer signifikant verminderten Aktivität der Alkalischen Phosphatase führt. Auch in den Chondrozytenkulturen muss man demnach davon ausgehen, dass erst eine Adaptation der Zellen an den oxidativen Stress erfolgen muss, bevor eine Steigerung der Mineralisation stattfinden kann.

Die optimale Sauerstoffkonzentration für eine Neochondrogenese wurde bisher noch nicht definiert (O`Driscoll et al., 1997). Niedrige Sauerstoffkonzentrationen führen in Knorpelzellkulturen zu einer höheren Proliferation und biosynthetischen Aktivität, jedoch bei kleinerer Zellgröße und einer Rückentwicklung zu mesenchymalen Zellen (Nevo et al., 1988; Ysart und Mason, 1994; Hansen et al., 2001). Eine maximale Knorpelproduktion und Bildung von Kollagen konnte in Kulturen von Hasenzellen bisher bei 15 - 21% Sauerstoff erreicht werden (O`Driscoll et al., 1997), bei Kulturen aus Schweinezellen bei 10 - 20% Sauerstoff (Grimshaw und Mason, 2000) und bei Kulturen aus Kälberzellen bei 20% Sauerstoff (Murphy und Sambanis, 2001). Knorpelwachstum benötigt demnach Sauerstoff und ist kein anaerober Vorgang.

Kontinuierlich hohe Sauerstoffkonzentrationen von 90% hemmen hingegen die Kollagenbildung und die Knorpelproduktion, vor allem durch die Entstehung von freien Radikalen, die Proteine, Lipide und DNS beschädigen. Die Folgen sind Nekrosen und Apoptosen (Janssen, 1993; Yuan, 1995; Malda et al., 2003). Der Zellmetabolismus von Knorpel wird jedoch auch durch zu niedrige Sauerstoffkonzentrationen von 1 - 5% reduziert, dann reicht die Versorgung mit Sauerstoff nur noch zum Überleben der Zellen, eine Kollagenbildung findet kaum noch statt (O`Driscoll et al., 1997; Murphy und Sambanis, 2001; Lee und Urban, 2002). Auf kurze Phasen von Sauerstoffmangel reagieren Knorpelzellen hingegen sehr unempfindlich, durch die ausreichend vorhandenen Glykolyseenzyme wird die Energieversorgung ermöglicht (Lane et al., 1977; Shapiro et al., 1997).

Sauerstoff ist demnach nicht zur Ernährung und Wachstum von Knorpel essentiell, aerobe Bedingungen können jedoch die Chondrogenese fördern. Sauerstoff ist ein Kontrollfaktor im Entwicklungs- und Wachstumsprozess von Knorpel (Malda et al., 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigen die in der Literatur bekannte relative Unempfindlichkeit von Knorpelzellen gegenüber verschiedenen Sauerstoffkon-

zentrationen, zeigen aber auch eine geringe Mineralisationsförderung durch intermittierende Hyperoxie. Die Chondrozyten, die hauptsächlich einen anaeroben Metabolismus mittels Glykolyse betreiben (Lane et al., 1977; Shapiro et al., 1997; Lee und Urban, 2002), werden durch die intermittierende Sauerstoffbehandlung keinesfalls in ihrer Funktion zur Mineralisation geschädigt. Die geringe Förderung der Mineralisation durch Sauerstoff war zumindest teilweise statistisch hoch signifikant.

5.3.2 Wirkung von Druck auf fetale Mäuseepiphysenzellen

Knorpel wird physiologisch Druck ausgesetzt. Während der Kompression entwickelt sich ein hydrostatischer Druck mit einem mechanischen Stimulus, ohne eine Deformierung der Zellen (Hansen et al., 2001). Durch den Druck werden die Knorpelzellen in einen engeren Kontakt zueinander gebracht und die Zellmembranen stabilisiert. Dies führt zu einer Unterstützung der Chondrogenese (Hall, 1970).

Bassett und Herrmann stellten im Jahre 1961 die Hypothese auf, dass eine mechanische Stimulierung von Stammzellen durch Druck in der Differenzierung zu Chondrozyten führt. Eine Dehnung von Kulturen führt zu einer Verformung der Zellen. Durch eine starke Dehnung entstehen weder Knochen, noch Knorpel, noch Kalzifikationen, sondern Sehnen und faszienartigen Strukturen (Bassett und Herrmann, 1961; Andrew und Bassett, 1962; Hall, 1970). Wirken lediglich leichte Zugkräfte auf Knorpelkulturen, kann dies eine Chondrogenese begünstigen (Hall, 1970).

In der Zellkultur von Knorpelzellen aus Rindern konnten kurze Druckphasen das Zellwachstum deutlich steigern, lange Druckphasen führten jedoch zu einer Hemmung der Proliferation (Hansen et al., 2001). In vivo zeigte sich, dass mechanische Stimuli für die Chondrogenese unabdingbar sind. Knorpeltransplantate wurden in Hühnerembryonen gesetzt, diese wurden dann paralytisiert. In den Embryonen, in denen keinerlei mechanische Stimuli stattfinden konnten, wurde auch kaum Knorpel gebildet. Wurden die Tiere nur vorübergehend paralytisiert, fand eine signifikante Knorpelbildung statt (Hall, 1970).

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass auch die enchondrale Mineralisation durch die Einwirkung von Druck auf die Knorpelkulturen signifikant gesteigert werden kann. Durch eine mehrtägige Einwirkung von intermittierendem Druck können sowohl der Cal-

ciumeinbau in die Kulturen als auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ausgeprägt gesteigert werden.

Eine kurzfristige Behandlung über einen oder 3 Tage scheint einen mechanischen Stress auf die Zellen auszuüben, der sich signifikant negativ auf die Mineralisation auswirkt. Dieses Phänomen ließ sich nach einem und 3 Behandlungstagen im Rückgang des Calciumeinbaus und auch in der Aktivitätsverminderung der ALP aufweisen. Das zeigt, auch an mechanischen Stress und nicht nur an oxidativen Stress müssen sich die Zellen zunächst adaptieren (s. Abbildung 16 und Abbildung 17).

Nach 5, 7 und 8 Behandlungstagen wurde der Calciumeinbau allein durch den Druck hoch signifikant gesteigert. Dies entspricht auch den Ergebnissen bei der Aktivitätssteigerung der ALP, nach 8 Behandlungstagen war diese Steigerung allerdings nicht signifikant. 4 Tage nach einer Behandlungsphase von 8 Tagen zeigten die Ergebnisse sowohl im Calciumeinbau als auch in der Aktivität der ALP deutliche Steigerungen durch den Druck, sie waren hoch signifikant (s. Abbildung 13 und Abbildung 14).

Dies zeigt, dass die Adaptationsmechanismen der Chondrozytenzellen auf Druck sich auch noch ohne den Stimulus positiv auf die Mineralisation auswirken.

In Übereinstimmung mit der Literatur lässt sich demnach sagen, dass die Wirkung von intermittierendem Druck auf Chondrozyten nicht nur physiologisch ist, sondern auch förderlichen Einfluss auf die Chondrogenese und die enchondrale Mineralisation ausübt.

5.3.3 Wirkung von HBO auf fetale Mäuseepiphysenzellen

In der Vergangenheit ist die Wirkung von hyperbarem Sauerstoff auf Knorpel bzw. Knorpelkulturen nur wenig untersucht worden.

Eine Kombination aus vermindertem Sauerstoff in der Atmosphäre und kurzen Druckphasen führt im Versuch mit Rinderknorpelkulturen zu einer Steigerung der Zellproliferation und zu einer vermehrten Kollagenproduktion (Hansen et al., 2001).

Aber auch der Einfluss von hyperbarem Sauerstoff kann sich positiv auf die Entstehung von Knorpel auswirken. Im Tierversuch konnte bei Ratten im Frakturkallus, unter der

Therapie mit zwei mal täglich eine Stunde reiner Sauerstoff bei einem bar (= 750 mmHg) und auch bei 3 bar (= 2250 mmHg), ein ausgeprägterer knorpeliger Kallus nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Unter der Therapie mit HBO wurde dieser Knorpel auch schneller kalzifiziert und zu Knochen umgebaut. Dieser Prozess ließ sich ab dem 15. Behandlungstag nachweisen, ab Tag 4 fand sich in der Behandlungsgruppe bereits mehr Knorpel (Yablon und Cruess, 1968).

In der vorliegenden Untersuchung konnten durch hyperbaren Sauerstoff keine deutlichen Veränderungen beim Calciumeinbau in den Kulturen bewirkt werden. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl bei kurzen Behandlungsphasen von ein und 3 Tagen als auch bei längeren Behandlungen von 5, 7 und 8 Tagen (s. Abbildung 13 und Abbildung 16). Bei den Aktivitätsmessungen der Alkalischen Phosphatase konnten überraschender Weise bereits nach einem und 3 Behandlungstagen signifikante Steigerungen gemessen werden, ebenfalls nach 7 Behandlungstagen (s. Abbildung 17). Die achttägige Behandlung führte weder direkt nach Behandlungsende, noch nach weiteren 4 Tagen zu signifikanten Veränderungen (s. Abbildung 15).

Diese uneinheitlichen Ergebnisse in der ALP-Aktivität, auch im Vergleich zu den Ergebnissen der Calciummessungen, sind entweder zufällig bedingt oder lassen sich auf die insgesamt geringe Probenanzahl (N=5) zurückführen.

Unter dem Einfluss von HBO gelingt es den Epiphysenzellen demnach eher, ihren Status quo im Zellstoffwechsel aufrecht zu erhalten. Die Zellen werden durch HBO nicht geschädigt, aber auch nicht ausgeprägt gefördert.

Die Ergebnisse von Yablon und Cruess (1968) konnten in den Versuchen nicht bestätigt werden, allerdings hatten Yablon und Cruess in ihren Versuchen Ratten zweimal täglich mit HBO behandelt und in vivo fand die verstärkte Mineralisation (elektronenmikroskopisch nachgewiesen) erst ab Tag 15 statt.

Eine womöglich ausgeprägtere Knorpelkalzifizierung unter der Therapie konnte durch die Messung von Calcium nicht und bei der Aktivitätsmessung der ALP nur teilweise nachgewiesen werden.