Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

# Effekt der Hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Differenzierung und Funktion Osteoporose-relevanter Parameter in humanen Osteoblasten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Pia Flender

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. med. Lisa Oezel

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Amin Polzin

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf alle Geschlechter.

## Zusammenfassung

Gemäß der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehört die Osteoporose weltweit zu einer der häufigsten Skeletterkrankungen im höheren Alter. Definitionsgemäß liegt bei der Osteoporose eine gestörte Knochenhomöostase mit vermehrtem Abbau vor, welche unter anderem durch eine verringerte Aktivität der Osteoblasten und reduzierte Expression des Osteoprotegerins (OPG) entsteht. Ein gestörtes Knochengleichgewicht bedingt eine verminderte Knochendichte, welche zu erhöhtem Frakturgeschehen und höherer Morbidität und Mortalität führen kann. OPG bindet in einer ausgeglichenen Knochenhomöostase an den *Receptor Activator of NF-κB* (RANK)-Liganden und verhindert die Aktivierung der Osteoklasten. Bei der Osteoporose kommt es durch eine vermehrte Aktivierung von Osteoklasten zu einem knochenabbauenden Prozess. Dieser entsteht immer dann, wenn insgesamt weniger OPG zur Verfügung steht und nicht mehr in einer ausreichenden Anzahl hemmend an RANKL binden kann. RANKL bindet daraufhin vermehrt an RANK und verursacht durch erhöhte Osteoklastenaktivierung einen vermehrten Knochenabbau und somit Knochenbrüchigkeit.

Bei der Hyperbaren Oxygenierung (HBO) atmet der Patient 100 %-igen, reinen Sauerstoff bei einem erhöhtem Umgebungsdruck über einen definierten Zeitraum in einer speziell hierfür vorgesehenen Kammer ein. Die HBO konnte in mehreren Studien ihren Nutzen für die Knochenregeneration unter Beweis stellen, aber es fehlen grundlegende Erkenntnisse zum Einfluss der HBO auf die osteogene Differenzierung älterer Patienten, insbesondere Osteoporose-Patienten. Somit stellt sich die Frage, inwiefern die osteogene Differenzierung und Osteoporose-relevante Parameter in Osteoblasten älterer Patienten durch den Einfluss der HBO und ROS-abbauender Substanzen moduliert werden können. Denn im Alter nimmt der Anteil reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu, welches die Pathogenese der Osteoporose ebenfalls unterstützt. Osteoblasten von 22 Patienten wurden entsprechend ihrer Knochendichte eingeteilt: Kontrolle (normwertige Knochendichte, Alter ∅ = 68,42), Osteopenie (Alter ∅ = 80) und Osteoporose (Alter ∅ = 79,75). Es folgten Experimente mit Osteoblasten der unterschiedlichen Knochendichten in osteogenem Differenzierungsmedium und die HBO-Behandlung, sowie die zusätzliche Behandlung mit dem Antioxidans Katalase (125 U). Anschließend wurde die osteogene Differenzierung mittels des *Alkalischen Phosphatase Assays* (AP) und der Alizarinrot-S-Färbung (ALZ, mit Rücklösung) evaluiert und Osteoporose-relevante Parameter durch das *OPG-Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und die RANKL-Polymerasekettenreaktion (PCR) quantifiziert.

Durch die HBO-Therapie kam es bei den Osteoblasten mit normaler Knochendichte und Osteopenie zu einer Steigerung der osteogenen Differenzierung, gemessen an der AP-Aktivität und der Kapazität, Kalzium in der extrazellulären Matrix zu deponieren. Des Weiteren konnten synergistische Effekte durch die Behandlung der HBO und der Katalase als Antioxidans in Osteoblasten von Patienten mit einer Osteopenie und Osteoporose im Vergleich zu Osteoblasten mit normwertiger Knochendichte detektiert werden. Die osteogene Differenzierung bei Osteoblasten mit normwertiger Knochendichte war durch die HBO, sowohl alleinig als auch in Kombination mit Katalase im Vergleich ohne die HBO, signifikant verdoppelt. Bei der Osteopenie wurde die osteogene Differenzierung durch die HBO auf bis zu 41 % gesteigert. Die AP-Konzentration konnte bei den Osteoporose-Osteoblasten durch die HBO auf bis zu 62 % gesteigert werden. Die OPG- und RANKL-Expression wurde nur tendenziell beeinflusst. Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass sowohl die osteogene Differenzierung als auch Osteoporose-relevante Parameter in Osteoblasten von älteren Patienten vor allem bei normwertiger Knochendichte und bei Osteopenie durch die HBO und Antioxidantien beeinflusst werden und zum Teil signifikante Veränderungen aufweisen konnten. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die HBO vor allem bei Patienten mit einer normwertiger Knochendichte sowie bei Osteopenie eine zusätzliche Therapieoption darstellt.

## Abstract

According to the World Health Organization (WHO), osteoporosis is one of the most common skeletal diseases of older people worldwide. By definition, osteoporosis is a disturbed bone homeostasis with increased breakdown, which, among other things, is caused by reduced osteoblast activity and reduced expression of osteoprotegerin (OPG). A disturbed bone balance causes reduced bone density, which can lead to increased fractures and higher morbidity and mortality. OPG binds to the Receptor Activator of NF-κB (RANK) ligand in balanced bone homeostasis and prevents osteoclast activation. In osteoporosis, increased activation of osteoclasts leads to a bone-breaking process. This always occurs when there is less OPG available overall and can no longer bind to RANKL in sufficient quantities. RANKL then binds increasingly to RANK and, through increased osteoclast activation, this causes increased bone loss and bone fragility.

During hyperbaric oxygenation (HBO), the patient breathes 100% pure oxygen at an increased ambient pressure for a defined period of time in a chamber specifically designed for this purpose. HBO has been able to demonstrate its benefit for bone regeneration in several studies, but fundamental information on the influence of HBO on osteogenic differentiation in older patients, especially osteoporosis patients, is lacking. This raises the question of the extent to which osteogenic differentiation and osteoporosis-relevant parameters in osteoblasts of older patients can be modulated by the influence of HBO and ROS-degrading substances. As we age, the proportion of reactive oxygen species (ROS) increases, which also supports the pathogenesis of osteoporosis. Osteoblasts from 21 patients were classified according to their bone density: control (normal bone density, age Ø = 68.42), osteopenia (age Ø = 80) and osteoporosis (age Ø = 79.75). This was followed by experiments with osteoblasts of different bone densities in osteogenic differentiation medium and HBO treatment, as well as additional treatment with the antioxidant catalase (125 U). Subsequently, osteogenic differentiation was evaluated using the alkaline phosphatase assay (AP) and alizarin red S staining (ALZ, with redissolution), and osteoporosis-relevant parameters were determined using the OPG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the RANKL polymerase chain reaction (PCR) quantified.

HBO therapy led to an increase in osteogenic differentiation in osteoblasts with normal bone density and osteopenia, measured by AP activity and the capacity to deposit calcium into the

extracellular matrix. Furthermore, synergistic effects could be detected by treating HBO and catalase as an antioxidant in osteoblasts from patients with osteopenia and osteoporosis compared to osteoblasts with normal bone density. Osteogenic differentiation in osteoblasts with normal bone density was significantly doubled by HBO, both alone and in combination with catalase, compared to without HBO. In osteopenia, osteogenic differentiation was increased up to 41% by HBO. The AP concentration in the osteoporosis osteoblasts could be increased up to 62% by HBO. OPG and RANKL expression were only tendentially affected. With the help of the present work, it was demonstrated that both osteogenic differentiation and osteoporosis-relevant parameters in osteoblasts from older patients are influenced by HBO and antioxidants, especially in the case of normal bone density and in osteopenia, and in some cases show significant changes. The results of this work indicate that HBO is an additional therapeutic option, especially in patients with normal bone density and osteopenia.

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| α | Alpha |
| Abb. | Abbildung |
| ADAM | Disintegrin- und Metalloproteinasen |
| AK | Capture Antibody |
| ALZ | Alizarinrot-S-Färbung |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| ASC | Adipöse mesenchymale Stammzellen |
| ata | Atmosphären absolut, technische Atmosphäre |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. |
| ß Gly | ß-Glycerophosphat |
| bar ü. N. | bar über Normal Null |
| BC | Body composition, Knochendichte |
| BG | Bioaktives Glas |
| bFGF | basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor |
| BLCs | Bone lining cells, Osteoblasten in ruhendem Zustand |
| BMC | Bone mineral content, Knochenmineralgehalt |
| BMI | Body mass index |
| cm | Zentimeter |
| $cm^2$ | Quadratzentimeter |
| $cm^3$ | Kubikzentimeter |
| °C | Grad Celsius |
| CTB | CellTiterBlue® |
| DCS | Dekompressionserkrankung bei Tauchern |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPBS | Dulbecco's phosphate buffered saline |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| DVO-Leitlinie | Dachverband-Osteologie-Leitlinie |
| DXA | Dual Energy X-Ray Absorptiometry |
| ELISA | Enzyme linked Immunosorbent Assay |
| et al. | und andere, mehrere Autoren |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FBS/FCS | Fetal Bone Serum (Fetales Bovines Serum) |
| g* | Erdbeschleunigung |
| g | Gramm |
| $g/cm^2$ | Gramm pro Quadratzentimeter |
| g/Tag | Gramm pro Tag |
| g/L | Gramm pro Liter |

| | |
|---|---|
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase |
| GPX | Gluthadionperoxidase |
| h | Stunden |
| hBMSCs | Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells / Mesenchymale Stromazellen des menschlichen Knochenmarks |
| HBO | Hyperbare Sauerstofftherapie |
| HCl | Chlorwasserstoff |
| Hcy | Homocystein |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| HIF-1α | Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α |
| $H_2O$ | Wasser |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid |
| IE | Internationale Einheit |
| IL-1ß | Interleukin-1ß |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| J | Joule |
| $kg/m^2$ | Kilogramm pro Quadratmeter |
| l | Liter |
| M | Molar |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| mg | Milligramm |
| mmHg | Millimeter-Quecksilbersäule |
| mRNA | messenger RNA |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| MMP-7 | Matrix-Metalloproteinase-7 |
| MSC | Mesenchymale Stromazellen |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NAFLD | Nichtalkoholische Fettlebererkrankung |
| NFκ-B | nuclear factor ´kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells |
| NGS | Normal Goat Serum |
| nM | Nanomolar |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NR-ASC | Non-Responder Adipogene Stammzellen |
| NSAR | Nicht steroidale Antirheumatika |
| NTCs | No-Template-Kontrollen |
| OCN | Osteocalcin |

| | |
|---|---|
| OD600 | Optical Densitiy 600 nm |
| OPD | Osteogenes Differenzierungspotenzial |
| OM-Medium | Osteogenes Differenzierungsmedium |
| OP | Operationssaal |
| OPG | Osteoprotegerin |
| $O_2$ | Sauerstoff |
| $O_2^-$ | Superoxidanionen |
| p | Probilitas, Wahrscheinlichkeit in der Statistik |
| $PaO_2/PO_2$ | Sauerstoffpartialdruck in arterieller Blutgasanalyse/ Sauerstoffpartialdruck |
| PBS | Phosphate-buffered Saline |
| $PcTO_2$ | Sauerstoffpartialdruck im Gewebe |
| PCR | RANKL-Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | pondus Hydrogenii, Maßeinheit für die Wasserstoffionenkonzentration |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| $P_i$ | anorganisches Phosphat |
| $PP_i$ | anorganische Diphosphate, Pyrophosphatasen |
| pg/ml | Pikogramm pro Milliliter |
| Px | Passage der Zellen Nummer x |
| qPCR | Real-Time PCR, quantitative PCR |
| RANK | Receptor activator of NFκ-B |
| RANKL | Receptor activator of NFκ-B ligand |
| RD | Reagent Diluent |
| rhBMP-2 | rekombinantes menschliches knochenmorphogenetisches Protein-2 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| sek | Sekunden |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SOPs | Standard Operating Procedures |
| TAE Puffer | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| Tab. | Tabelle |
| TACE/ADAM17 | Tumor-Nekrose-Faktor-α-Converting-Enzym |
| TBSA | Total body surface area, Körperoberfläche |
| TEP | Totalendoprothese |
| TGF-ß | Transforming growth factor-ß |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| U/ml | Units pro Milliliter |
| U/µl | Units pro Mikroliter |
| UV | Ultraviolett |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |

| | |
|---|---|
| W | Watt |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| z. B. | zum Beispiel |
| % | Prozent |
| < / > | Kleiner als / größer als |
| ≤ / ≥ | Kleiner gleich / größer gleich |
| ≈ | circa, ungefähr gleich, gerundet |
| λ | Lambda |

# Inhaltsverzeichnis

**Zusammenfassung** **III**

**Abstract** **IV**

**Abkürzungsverzeichnis** **IV**

**Abbildungsverzeichnis** **VIII**

**Tabellenverzeichnis** **IX**

**1. Einleitung** **1**

1.1. Aufbau des Knochengewebes 1
1.1.1. Die Bedeutung der Osteoblasten für die Knochenhomöostase 2
1.1.2. Osteogene Differenzierung und Osteoblastenfunktionen 4

1.2. Pathologische Veränderungen des Knochengewebes 6
1.2.1. Osteopenie und Osteoporose 6
1.2.2. Osteoporose-relevante Parameter 9

1.3. Therapie der Osteoporose 10
1.3.1. Bisherige Therapie der Osteoporose 10
1.3.2. Therapieoptionen der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) 13
1.3.3. Hyperbare Sauerstofftherapie und Osteoporose 15

1.4. Fragestellung der Arbeit 16

**2. Material** **21**

2.1. Verbrauchsgegenstände 21

2.2. Geräte 23

2.3. Chemikalien und Zusätze 25

2.4. Kits 26

2.5. Primer 27

2.6. Medien und Lösungen 27

2.7. Zellen 28

2.8. Software 28

**3. Methodik** **29**

3.1. Patientenkollektiv 29

3.2. Zellkulturmethoden 29
3.2.1. Isolation von humanen Osteoblasten aus Hüftköpfen 29
3.2.2. Ansetzen des Kultivierungs- und des Differenzierungsmediums 30
3.2.3. Passagierung und Zellkulturpflege der Osteoblasten 30
3.2.4. Kryokonservierung von Osteoblasten 31
3.2.5. Auftauen von Osteoblasten 31
3.2.6. Versuchsvorbereitung der Osteoblasten 31
3.2.7. Hyperbare Sauerstofftherapie und osteogene Differenzierung 33

3.2.8. Einfluss der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) auf den pH-Wert 35
3.2.9. Alizarinrot-S-Färbung zur Kalziumdetektion 35
3.2.10. Bestimmung der Zellzahl mittels CellTiterBlue®-Assay 36
3.2.11. Durchführung des Alkalischen Phosphatase-Assays 37

3.3. Molekularbiologische Methoden 37
3.3.1. RNA-Isolation aus Osteoblasten mit Hilfe des RNA-Easy-Mini-Kits (QIAshredder, QIAGEN GmbH) 37
3.3.2. Bestimmung der RNA-Konzentrationen 38
3.3.3. Reverse Transkription der RNA der Osteoblasten 38
3.3.4. Analyse der RANKL-Genexpression mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction 39
3.3.5. Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Amplifikatlänge 41

3.4. Proteinbiochemische Methoden 41
3.4.1. Durchführung des OPG-ELISA 41

3.5. Statistische Methoden 42

**4. Ergebnisse 44**

4.1. Einfluss der HBO und der Katalase auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten 44
4.1.1. Osteogene Differenzierung unter Standardbedingungen 47
4.1.2. Osteogene Differenzierung unter Einfluss der HBO 49
4.1.3. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung 50
4.1.4. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten 51
4.1.5. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten 52

4.2. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung durch das Alkalische Phosphatase-Assay 53
4.2.1. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase in Osteoblasten von Patienten mit normwertiger Knochendichte 53
4.2.2. Bestimmung der Alkalischen Phophatase in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten 54
4.2.3. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten 55

4.3. Die Untersuchung von Osteoporose-relevanten Parametern 55
4.3.1. OPG-Expression in Osteoblasten 56
4.3.2. OPG-Expression in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten 57
4.3.3. OPG-Expression in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten 59

4.4. Vergleichende Analyse der RANKL-Expression 60
4.4.1. Evaluation der RANKL-Expression in Osteoblasten 61
4.4.2. RANKL-Expression in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten 63
4.4.3. RANKL-Expression in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten 64

**5. Diskussion 69**

5.1. Auswirkungen der Hyperbaren Sauerstofftherapie auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten 70

5.2. Auswirkungen der additiven Behandlung mit dem Antioxidans Katalase auf die osteogene Differenzierung 76

5.3. Schlussfolgerung und Abschlussbetrachtung 80
5.3.1. Auswirkungen der HBO auf die Differenzierung und Funktion Osteoporose-relevanter Parameter in humanen Osteoblasten 80
5.3.2. Auswirkungen von Katalase auf die Differenzierung und Funktion Osteoporose-relevanter Parameter in humanen Osteoblasten 81
5.4. Limitationen und methodische Selbstkritik 82
5.5. Ausblick 83

**6. Literaturverzeichnis 90**

**7. Danksagung 96**

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema Knochenaufbau, eigene Abbildung, modifiziert nach Uffig, 2019..... 1
Abbildung 2: Osteoblasten Kontrollgruppe (Tag 0) ..... 2
Abbildung 3: Osteon – Mineralisierung (modifiziert nach: https://www.medizin-kompakt.de/osteon, aufgerufen am 03.03.2022) ..... 3
Abbildung 4: Umwandlung Osteoblast zu Osteoid (gemäß Erklärung Ulfig.2019a)..... 4
Abbildung 5: Osteogene Differenzierung von MSCs (eigene Abbildung, modifiziert nach (Infante and Rodríguez, 2018) ..... 5
Abbildung 6:Schema Normwertige Knochendichte (oben) vs. Osteoporose/Osteopenie (unten) (modifiziert nach https://www.netdoktor.de/krankheiten/osteoporose/, aufgerufen am 03.04.2022) ..... 8
Abbildung 7: Schema Phasen des Knochenaufbaus (eigene Abbildung, modifiziert nach J.D. Ringe, 2019)..... 9
Abbildung 8: HBO HAUX Labor UKD ..... 16
Abbildung 9: Versuchsansatz Aussäen Osteoblasten..... 33
Abbildung 10: Pipettierschema PCR GAPDH und RANKL ..... 40
Abbildung 11: Übersichtsaufnahme Alizarinrot-S Färbung Tag 21 gesunde Osteoblasten (links), osteopenische Osteoblasten (rechts), osteoporotische Osteoblasten (unten), Fotografie..... 45
Abbildung 12: Alizarinrot-S Zeiss-Auflichtmikroskop; links Tag 0, Mitte Tag 21 ohne HBO, rechts Tag 21 mit HBO ..... 46
Abbildung 13: Alizarinrot-S Zeiss-Auflichtmikroskop, links Tag 0, Mitte Tag 21 ohne HBO, rechts Tag 21 mit HBO ..... 47
Abbildung 14: Alizarin-Rot-S ohne HBO Tag 21, Einteilung Normwertige Knochendichte / Osteopenie / Osteoporose und Medienzusätze..... 48
Abbildung 15: Alizarin-Rot-S mit HBO Tag 21, Einteilung Normwertige Knochendichte/Osteopenie/Osteoporose und Medienzusätze..... 49
Abbildung 16: Alizarin-Rot-S Rücklösung Kontrolle (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium, OD = optische Dichte)..... 50
Abbildung 17: Alizarin-Rot-S Rücklösung Osteopenie (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium, OD = optische Dichte)..... 51
Abbildung 18: Alizarin-Rot-S Rücklösung Osteoporose (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium, OD = optische Dichte)..... 52
Abbildung 19: Relative Alkalische Phosphatase Kontrolle (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 53
Abbildung 20: Relative Alkalische Phosphatase Osteopenie (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 54
Abbildung 21: Relative Alkalische Phosphatase Osteoporose (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 55
Abbildung 22: OPG Kontrolle Tag 14 (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)..... 56
Abbildung 23: OPG Kontrolle Tag 14 (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)..... 57
Abbildung 24: OPG Osteopenie Tag 14 (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)..... 58
Abbildung 25: OPG Osteopenie Tag 21 (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)..... 58

Abbildung 26: OPG Osteoporose Tag 14 (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 59
Abbildung 27: OPG Osteoporose Tag 21 (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 60
Abbildung 28: RANKL Tag 14 Kontrolle (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 61
Abbildung 29: RANKL Tag 21 Kontrolle (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 62
Abbildung 30: RANKL Tag 14 Osteopenie (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 63
Abbildung 31: RANKL Tag 21 Osteopenie (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 64
Abbildung 32: RANKL Tag 14 Osteoporose (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 65
Abbildung 33: RANKL Tag 21 Osteoporose (* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium) ..... 65

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsgegenstände ..... 22
Tabelle 2: Geräte ..... 25
Tabelle 3: Chemikalien und Zusätze ..... 26
Tabelle 4: Kits ..... 27
Tabelle 5: Primer ..... 27
Tabelle 6: Medien und Lösungen ..... 28
Tabelle 7: Zellen ..... 28
Tabelle 8: Software ..... 28

# 1. Einleitung

## 1.1. Aufbau des Knochengewebes

Knochengewebe besteht unter anderem aus Osteozyten, Osteoblasten, *Bone Lining*-Zellen und Osteoklasten, aber auch Kollagen Typ 1, Glycoproteinen und Proteoglykanen, sowie zu über 75 % aus Hydroxylapatit. Das Osteoid, welches noch nicht mineralisierte, weiche Matrix des Knochengewebes darstellt, besteht aus Fasern und Grundsubstanz und wird vor allem durch die Osteoblasten gebildet. Es werden Hydroxylapatitkristalle zur Mineralisation des Knochens in die Matrix eingebaut.

Osteoblasten übernehmen den Teil des Knochenaufbaus in der Knochenhomöostase. Osteozyten, die sich in Lakunen im Knochen befinden, sind für Homöostase und Abbauprozesse zuständig.

Bei der Knochenbildung entsteht zunächst Geflechtknochen, welcher anschließend durch Umbauprozesse zu Lamellenknochen wird. Beim Lamellenknochen unterscheidet man zwischen der *Substantia compacta* (kompakte und außenliegende Knochenteile) und der *Substantia spongiosa* (dünne Knochenbälkchen, die im Inneren des Knochens liegen). Die innere Oberfläche, die beide Knochenteile umschließt, bildet das Endost, welches nochmals von Periost umschlossen ist (Abb. 1) (Ulfig, 2019b).

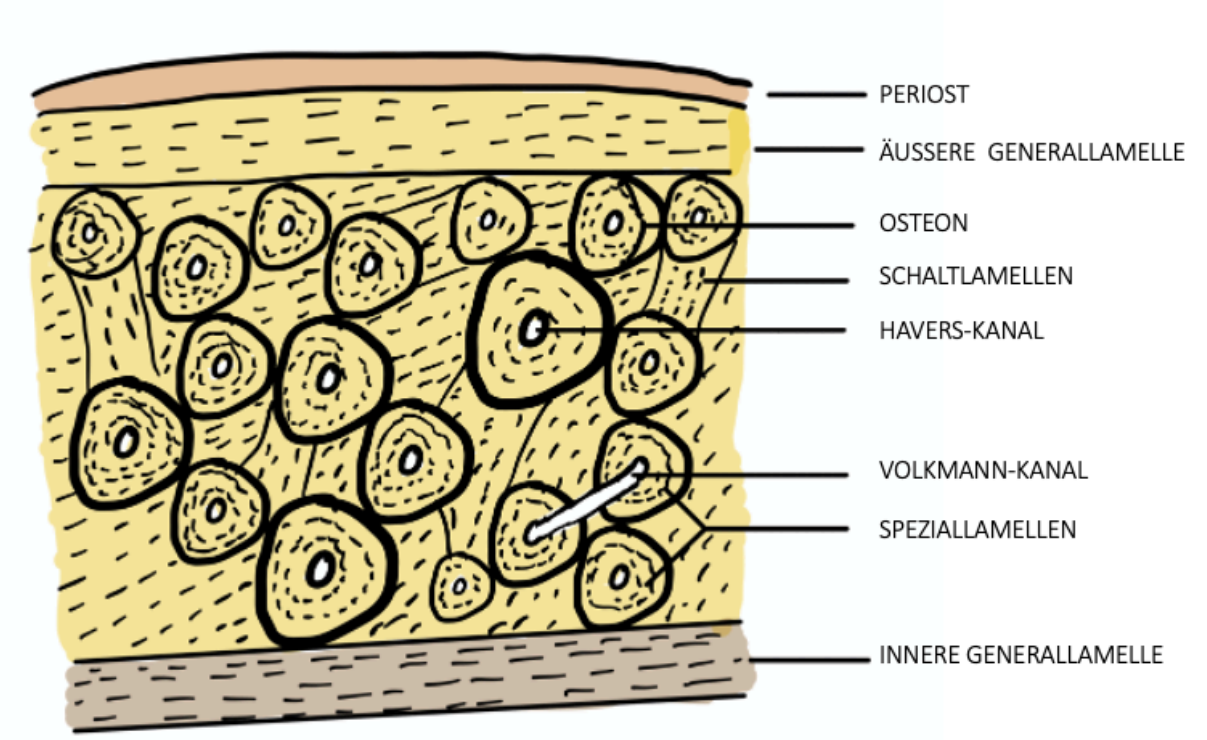



***Abbildung 1:*** *Schema Knochenaufbau, eigene Abbildung, modifiziert nach Uffig, 2019*

### 1.1.1. Die Bedeutung der Osteoblasten für die Knochenhomöostase

Die Knochenhomöostase wird durch verschiedene, miteinander in Kontakt stehende Zellen, wie den Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten, aufrechterhalten. Die Knochenhomöostase wird durch Resorption des Knochens durch die Osteoklasten und Knochenbildung durch die Osteoblasten gesteuert (Ulfig, 2019b).

Osteoblasten reifen aus mesenchymalen Stromazellen (MSCs) heran. Dabei entwickeln sich Osteoprogenitorzellen und es werden daraus Osteoblasten synthetisiert. Diese sichern u. a. die Kollagensynthese, sowie die Synthese der Alkalischen Phosphatase und Matrixvesikel. Wie in Abb. 2 zu sehen sind Osteoblasten im Ruhezustand flache Zellen mit wenigen Zellorganellen. Im aktiven Zustand ändert sich ihre Form in eine kubische Zelle mit vielen Zellorganellen wie z. B. rauem Endoplasmatischem Retikulum, vielen Mitochondrien, einem großen Zellkern oder auch einem Golgi-Apparat (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

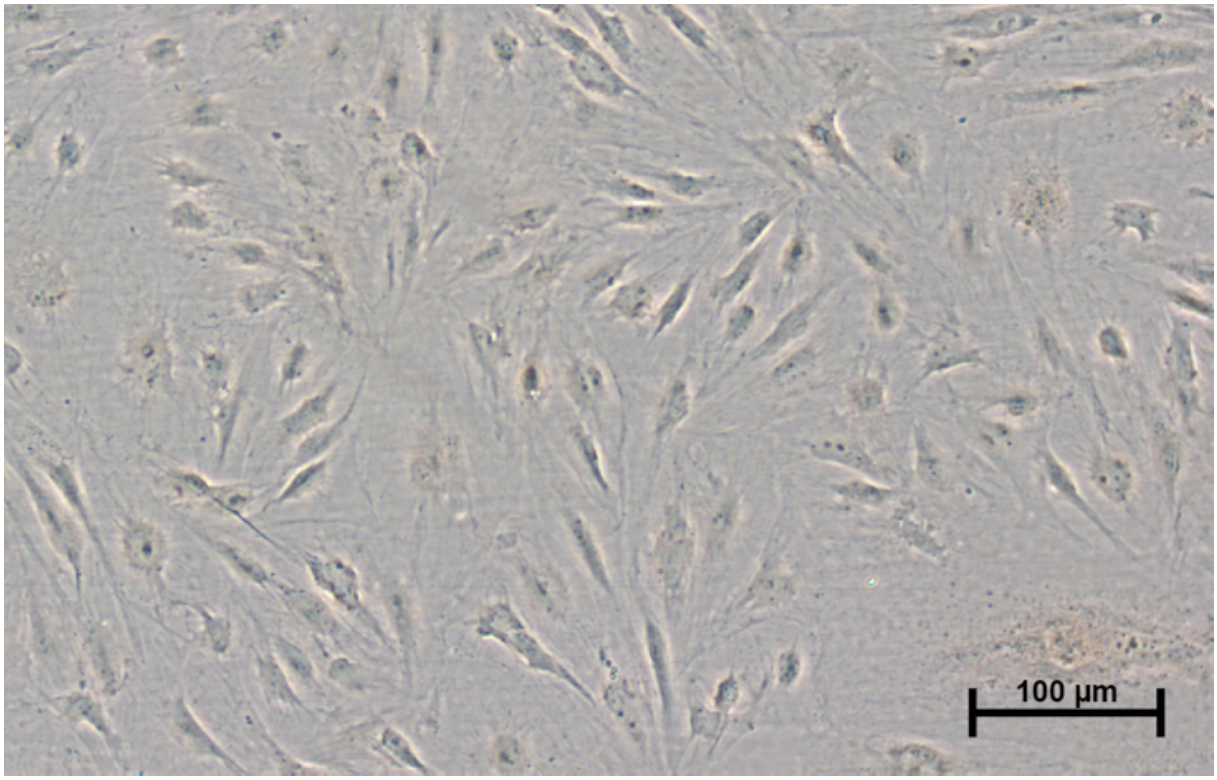



***Abbildung 2:*** *Osteoblasten Kontrollgruppe (Tag 0)*

Aktive Osteoblasten zeigen sich unter dem Lichtmikroskop mit noch nicht mineralisierter Matrix, dem Osteoid. Osteoblasten werden nach ihrer Funktion im Knochenaufbau in verschiedene Kategorien eingeteilt. Hierbei werden Apoptose, inaktiver Zustand oder eine

Differenzierung zu Osteozyten und Verbleib im Osteoid unterschieden (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019). Abb. 3 veranschaulicht, dass im Osteoid dendritische Fortsätze gebildet werden, über die die Zellen über *Gap junctions* mit anderen Osteozyten kommunizieren können. Es kommt zur Mineralisierung der Matrix. Nachrückende Osteoblasten bilden die nächste Lamelle. Matrixvesikel in einer Größe von ca. 70 nm werden abgeschnürt und im Osteoid abgelegt. Diese Vesikel exprimieren auf der Außenseite die Alkalische Phosphatase (AP). Die AP baut die anorganischen Diphosphate ($PP_i$), welche die Hemmung der Mineralisierung bedingen würden, in anorganisches Phosphat ($P_i$) um. In den Matrixvesikeln selbst entstehen Hydroxylapatitkristalle, welche durch Zerreißen der Membran im Extrazellularraum an Kollagenfibrillen angelagert werden, um dort die Festigung der Matrix zu bedingen. Die Gesamtheit der Homöostase wird im Osteon zusammengefasst (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

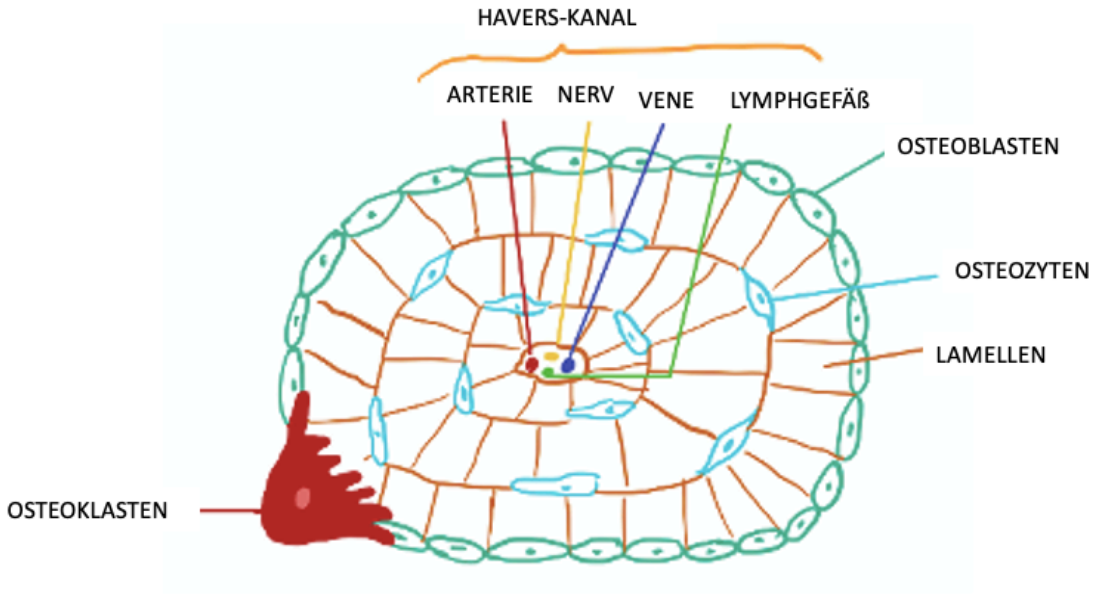



***Abbildung 3**: Osteon – Mineralisierung*
*(modifiziert nach: https://www.medizin-kompakt.de/osteon, aufgerufen am 03.03.2022)*

Bei chronischen Knochenerkrankungen wie z. B. der Osteoporose oder der Osteopenie liegt ein über Jahre bestehendes Ungleichgewicht vor. Dieses Ungleichgewicht wird bestimmt durch ein Missverhältnis einer verminderten Aktivität von Osteoblasten im Vergleich zu einer erhöhten Aktivität von Osteoklasten. Die gestörte Homöostase entsteht u. a. durch eine Fehlregulation der Expression von Zytokinen und durch einen gestörten extrazellulären „OPG/RANKL/RANK-Signalweg“ oder dem Ephrin2/ephB4-Signalweg. Diese haben einen Effekt auf Differenzierung und Apoptose von Osteoklasten (Chen *et al.*, 2018).

### 1.1.2. Osteogene Differenzierung und Osteoblastenfunktionen

Die Ossifikation wird in die desmale (direkte) und die chondrale (indirekte) Ossifikation aufgeteilt. Die desmale Ossifikation findet in der Embryonalentwicklung vor allem bei Schädelknochen, Gesichtsknochen oder des Schlüsselbeins statt. Hierbei entsteht der Knochen direkt aus den Mesenchymzellen durch starke Kapillarisierung und Umwandlung in Osteoblasten (Ulfig, 2019a). Die Osteoblasten sind für die Synthese des Osteoids verantwortlich. Durch die Osteoblasten kommt es zu einer Verkalkung des Osteoids (Abb. 4). Es folgt eine Abgabe der Vesikel, mit Kalziumphosphatkristallen im Inneren des Osteons, durch Osteoblasten. Die Vesikel eröffnen sich und es werden Kristalle freigesetzt, die sich an die Kollagenfasern anlagern. Die Kristalle nehmen an Volumen zu und es kommt zu einer Umwandlung in Hydroxylapatitkristalle. Charakteristisch für die Osteoblasten ist die membranständige Alkalische Phosphatase, welche Kalzium in die extrazelluläre Matrix einbaut. Wie in Abb. 4 zu sehen, dringen die Osteoblasten in das Osteon ein, sodass sie weiter nach zentral in das Osteon vordringen können. Hier in der Interzellularsubstanz angekommen und von der Substanz ummauert, werden sie als Osteozyten bezeichnet (Ulfig, 2019a).

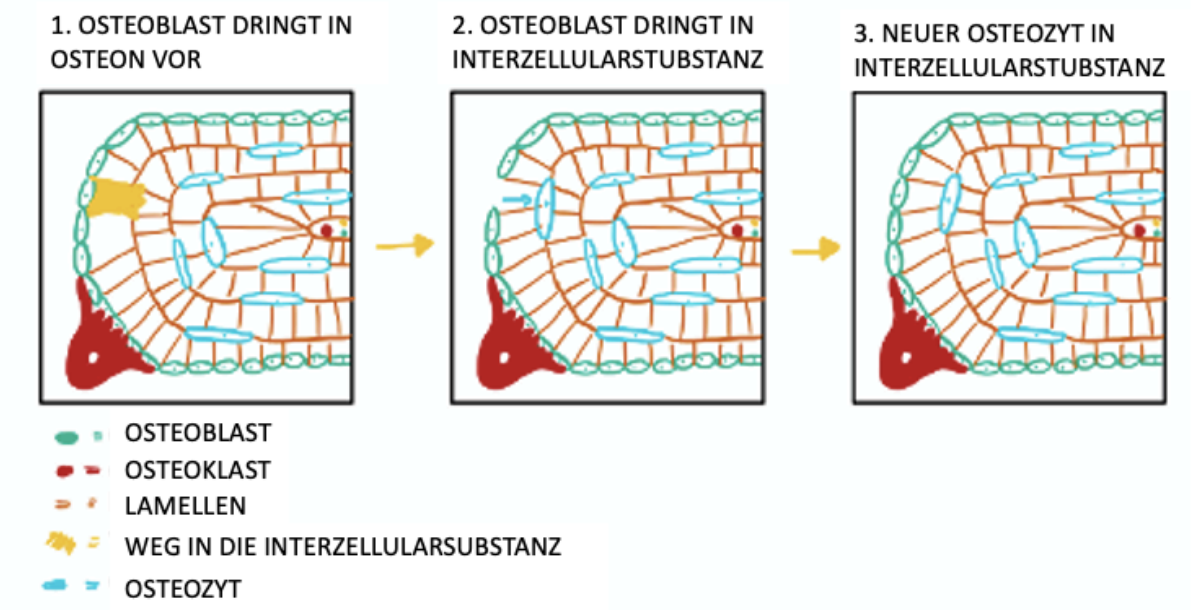



***Abbildung 4:*** *Umwandlung Osteoblast zu Osteoid (gemäß Erklärung Ulfig.2019a)*

Die Außenseite des Osteons bildet der Osteoblastensaum, die Innenseite der Havers-Kanal. Ein appositionelles Wachstum des Osteons entsteht, indem immer wieder Osteoblasten an der Außenseite neu angelagert werden, wieder bis in die Interzellularsubstanz des Osteons

vordringen und in einem kontinuierlichen Prozess für Wachstum sorgen. Auf der Innenseite des Knochens wird ein Abbauprozess durch die Osteoklasten initiiert, der dem Aufbauprozess der Osteoblasten entgegenwirkt (Abb. 4) (Ulfig, 2019a).
Bei der chondralen Ossifikation entsteht zuerst aus mesenchymalem Bindegewebe ein hyaliner Gerüstknorpel, welcher später den eigentlichen Knochen darstellt. Dieser Bereich der Ossifikation findet vor allem an sich noch entwickelnden Röhrenknochen statt oder bei der Knochenbruchheilung. Der Prozess wird nochmals durch die perichondrale Ossifikation (außen) und die enchondrale Ossifikation (innen) unterschieden. Bei der perichondralen Ossifikation werden Perichondriumzellen zu Osteoblasten, die eine Knochenmanschette bilden. Bei der enchondralen Ossifikation vergrößern sich Knorpelzellen, es kommt zum Einwachsen von Blutgefäßen und zur Bildung von Verkalkungsherden. Die Blutgefäße dringen in die Verkalkungsherde ein und mit diesen auch Mesenchymzellen. Hier werden dadurch neue Osteoblasten gebildet (Ulfig, 2019a).

Wie in Abb. 5 zu sehen, beginnt die osteogene Differenzierung mit den MSCs, welche sich in den Anfangsstadien der Osteogenese stark vermehren. Aus MSC werden Prä-Osteoblasten differenziert. Eine weitere Reifung zu nicht-proliferierenden Osteoblasten folgt, welche an Matrixsekretion, Mineralisierung und Reifung des Knochens beteiligt sind. Sobald die extrazelluläre Matrix gebildet wird, werden entweder Osteozyten gebildet, die Apoptose wird eingeleitet oder die Osteoblasten werden in den ruhenden Zustand differenziert (BLCs). Die Produkte AP und Osteocalcin werden dabei von den Osteoblasten sezerniert (Infante and Rodríguez, 2018).

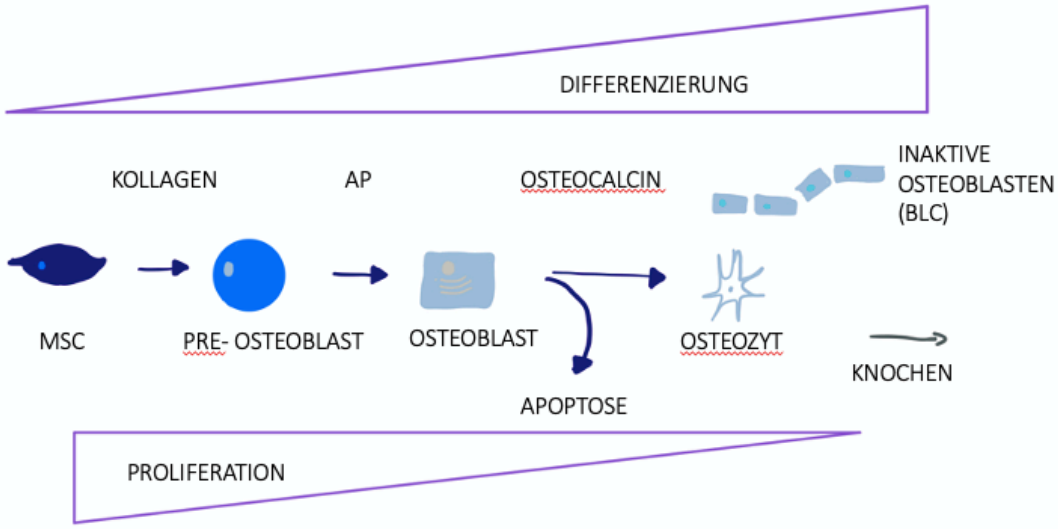



*Abbildung 5: Osteogene Differenzierung von MSCs (eigene Abbildung, modifiziert nach (Infante and Rodríguez, 2018)*

Bei der chondralen Ossifikation entstehen verschiedene Zonen: Reservezone (ruhender Knorpel, Epiphyse), Proliferationszone (Zellsäulen), Hypertrophiezone (Hypertrophie und Verkalkung), Resorptions- und Eröffnungszone (Abbau des Knorpels) und Verknöcherungszone (Knochensubstanz) (Ulfig, 2019a).

## 1.2. Pathologische Veränderungen des Knochengewebes

### 1.2.1. Osteopenie und Osteoporose

Die Osteoporose gilt weltweit als eine der häufigsten systemischen Knochenerkrankungen, deren Inzidenz mit zunehmendem Alter steigt. Stand 2009 wurden 6,3 Millionen Betroffene bei 885.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ermittelt (Al Hadi *et al.*, 2015).

Die Osteoporose lässt sich in eine primäre und sekundäre Osteoporose unterteilen. Erstere betrifft Männer über 60 Jahre und postmenopausale Frauen, zweitere wird durch Risikofaktoren, wie z. B. Untergewicht (BMI < 20 kg/m$^2$), Diabetes mellitus, Alkoholabusus (Männer ≥ 30 g/Tag, Frauen ≥ 20 g/Tag) und Medikamente, wie z. B. die Einnahme von unter anderem Cortison oder Aromatasehemmern induziert.
Es ist bekannt, dass sich im Rahmen von Alterungsprozessen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) anhäufen, wodurch oxidativer Stress entstehen kann. ROS können die osteogene Differenzierung inhibieren und sogar die adipogene Differenzierung fördern. Dies ist mit ursächlich für das Entstehen von Fettzellen, die man bei Osteoporose-Patienten im Knochen vermehrt detektieren kann (Al Hadi *et al.*, 2015).

Alterung als wichtiger Risikofaktor für das Entstehen einer Osteoporose wird in der Literatur divers diskutiert. Es kommt insgesamt zu einer Verringerung der Knochenmasse. Auf zellulärer Ebene wird beschrieben, dass die MSCs bei Patienten mit steigendem Alter eher in Richtung Adipogenese als in Richtung der Osteogenese differenzieren (Infante and Rodríguez, 2018). Dies führt dann zu einer Verminderung der Knochenneubildung und somit zur Osteoporose. Die Knochenhomöostase ist im Alter verändert, was auch mit einem beginnenden Knochenabbau ab dem dritten Lebensjahrzehnt zusammenhängt. Im frühen Erwachsenenalter (Wachstumsstadium) ist das Gleichgewicht dahingehend verschoben, dass es zu einem vermehrten Aufbau des Knochens kommt. Mit fortschreitendem Alter und nach der Wachstumsphase verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung Abbau des Knochens. Bei

älteren Menschen kommt es dementsprechend zu einer Abnahme der Knochenmineraldichte (Infante and Rodríguez, 2018).

Alterungsprozesse sind auch gekennzeichnet durch Verlust von motorischer Kontrolle, Muskelmasse und dynamischer Haltungskontrolle. Diese Faktoren können zu einer erhöhten Sturzneigung führen (Ganança *et al.*, 2010). Hinzu kommt, dass Patienten mit einer Osteopenie oder Osteoporose durch die verminderte Knochenmasse anfälliger dafür sind, Frakturen zu erleiden, selbst wenn es sich um Niedrigenergietraumata handelt (Weir and Culmer, 2004). Patienten empfinden nachweislich aufgrund dieser Stürze eine Minderung der Lebensqualität. Zudem ist aufgrund der Schwere der Unfälle mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität zu rechnen (Kanis, 2002).

Bei der Osteoporose zeigt sich eine Veränderung der Mikroarchitektur. Diese umfasst neben einer Veränderung der Knochendichte auch Veränderungen in der Ausrichtung des Knochens sowie den Verzweigungen und Vernetzungen der Trabekel in der Spongiosa. Durch die Veränderung der Knochenarchitektur kann es ebenfalls zu einer Veränderung der Funktion kommen. Wie in Abb. 6 zu sehen ist bei jungen Patienten mit normaler Knochendichte histologisch vor allem eine starke Verbindung der Spongiosa mikroskopisch und auch makroskopisch sichtbar. Mit zunehmendem Alter und damit einhergehender verminderter Knochendichte verbleiben lediglich die Kanten der Trabekel als Strukturen und geben somit einen Resthalt (J. D. Ringe, 2019).

***Abbildung 6**:Schema Normwertige Knochendichte (oben) vs. Osteoporose/Osteopenie (unten) (modifiziert nach https://www.netdoktor.de/krankheiten/osteoporose/, aufgerufen am 03.04.2022)*

Zur Messung der Knochendichte (*body composition*, BC) wird die DXA-Messung (*Dual Energy X-Ray Absorptiometry*) herangezogen. Diese misst den Knochenmineralgehalt (*bone mineral content*, BMC) und kann die Knochendichte verschiedenster Areale des Patienten (Marra *et al.*, 2019) bestimmen.

Die Dichte des Knochens wird anhand der Abschwächung von emissionsarmen Röntgenstrahlen im Gewebe bestimmt. Zur Beurteilung dienen vor allem Femur und Wirbelkörper als Referenzstrukturen (Kaul *et al.*, 2012).

Als Ergebnis der DXA-Messung erhält man einen *T-Score* in g/cm2, welcher angibt, wie weit die ermittelte Knochendichte von der eines jungen, erwachsenen Menschen abweicht. Bei einem *T-Score* oberhalb von oder gleich - 1 liegt eine normwertige Knochendichte vor. Bei einem *T-Score* zwischen - 1 und - 2,5 spricht man von einer Osteopenie. Liegt der *T-Score* unter einem Wert von - 2,5, liegt das Krankheitsbild der Osteoporose vor. Das Frakturrisiko nimmt insgesamt mit abnehmender BMC zu (Eriksen, 2012).

Für die Entstehung der beiden Erkrankungen ist vor allem ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbauprozessen des Knochens verantwortlich. Nach der „*Coupling*-Hypothese“ ist die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur des Knochens durch eine ausgewogene Konkurrenz

der Aufbau- und Resorptionsvorgänge anzustreben (Abb. 7). Diese ist nicht nur von den systemisch wirksamen Hormonen abhängig, sondern auch von der Skelettbilanz, bei der die Abstimmung der beiden Prozesse aufeinander eine wichtige Rolle spielt („*coupling*“). Als „*Uncoupling*“ wird sinngemäß also ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau des Knochens bezeichnet, welche dann zum Verlust der Knochendichte führt (J. D. Ringe, 2019).

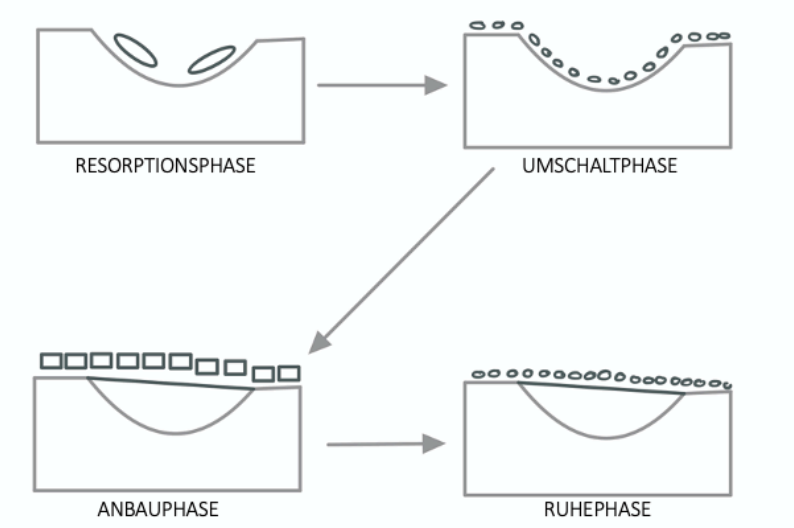



***Abbildung 7:*** *Schema Phasen des Knochenaufbaus (eigene Abbildung, modifiziert nach J.D. Ringe, 2019)*

### 1.2.2. Osteoporose-relevante Parameter

Laut Literatur gibt es wichtige Osteoporose-relevante Parameter, die die Osteoporose beeinflussen. Diese sind Osteoprotegerin (OPG), *Receptor Activator of NF-κB*-Ligand (RANKL) und *Receptor Activator of NF-κB* (RANK). Der OPG/RANK/RANKL-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Osteoklasten (Boyce and Xing, 2008).

OPG ist ein Glycoprotein, welches als löslicher Rezeptor nicht nur von Osteoblasten, sondern auch von verschiedenen anderen Zellen unseres Körpers wie z. B. den Herzzellen sezerniert wird. OPG wird weitergehend auch als Osteoklasten-Hemmstoff bezeichnet, da es die Differenzierung der Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen verhindert (Li *et al.*, 2007).

OPG wird unter anderem bei der Krankheit Osteopetrose (Albers-Schönberg-Syndrom) aufgrund einer erblichen Unterfunktion der Osteoblasten überexprimiert. Bei der Osteopenie und Osteoporose liegt eine vermehrte Osteoklastenaktivität und -differenzierung vor, welche zu vermehrtem Knochenabbau führt (Simonet *et al.*, 1997).

RANKL ist ein homotrimeres Transmembranprotein (Makromolekül aus drei gleichartigen Bausteinen), welches sowohl von Osteoblasten als auch von Immun- und Tumorzellen exprimiert wird und als membrangebundener oder sezernierender Ligand vorliegt. Von der Zelloberfläche abgespalten werden kann RANKL durch Metalloproteasen, den Tumor-*Nekrose-Faktor-α-Converting*-Enzymen (TACE/ADAM17). Ein Anstieg der RANKL-Konzentration bedingt eine gesteigerte Knochenresorption und somit die Entstehung von u. a. Osteoporose. (Belibasakis *et al.*, 2011).

RANK ist ein Transmembranrezeptor, der von unterschiedlichen Zellen, u. a. von Osteoklasten, gebildet wird (Reiner Bartl, 2021). RANKL bindet an RANK und aktiviert daraufhin nachgeschaltete Signalwege unter der Verwendung von *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors* (TRAFs). Die nachgeschalteten Signalwege (z. B. NF-κB-Kinase, c-myc) regulieren die Bindung, Aktivierung und das Überleben von Osteoklasten direkt. OPG, welches in vielen Zellen wie z. B. Osteoblasten exprimiert wird, agiert durch das Abfangen von RANKL. Durch diesen Schritt kann RANKL nicht mehr an RANK als Rezeptor auf der Oberfläche von Osteoklasten binden und die Aktivierung der Osteoklasten bleibt aus (Boyce and Xing, 2007).
Durch das Wnt-Catenin-Regulationssystem wird vor allem die OPG-Expression moduliert (Boyce *et al.*, 2005).

## 1.3. Therapie der Osteoporose

### 1.3.1. Bisherige Therapie der Osteoporose

Nach Erkenntnissen aus der aktuellen Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF) gilt vor allem für Männer und postmenopausale Frauen zunächst eine Basistherapie durch Zufuhr von Kalzium und Vitamin D. Als präventive Maßnahmen sind zudem zunächst ein barrierefreies Umfeld zu nennen, sowie eine Glucocorticoidreduktion (bei Glucocorticoidaufnahme aufgrund von z. B. chronisch obstruktiver Lungenerkrankung) auf ein Minimum (< 7,5 mg Prednisolon) bei verschiedensten Grunderkrankungen. Zudem stützt eine psychosoziale Betreuung bei Angst vor weiteren Sturzereignissen, um zukünftigen Mobilitätseinschränkungen entgegenzuwirken. Osteoporose-Patienten wird die Einnahme von 1000 mg Kalzium pro Tag mit der Nahrungsaufnahme empfohlen. Wird dieses Ziel nicht durch die reine Nahrungsaufnahme

gewährleistet, kann es durch Supplementierung von Kalzium zusätzlich erfolgen. Zudem wird eine Einnahme von Vitamin D3 von 800 – 1000 IE (internationale Einheiten) pro Tag empfohlen (S3-Leitlinie Osteoporose, 2019)

Es konnte gezeigt werden, dass eine alleinige, isolierte Einnahme von Vitamin D3 keine signifikante Reduktion des Frakturrisikos von älteren Patienten bewirkt, dass jedoch die kombinierte Einnahme von Vitamin D3 und Kalzium eine Risikoreduktion bewirkt (Watts *et al.*, 2003).
Positive Effekte auf den Knochenstoffwechsel konnten durch eine Kombination von Radontherapie, Bäderkur und Bergwandern nachgewiesen werden, diese sind jedoch nicht von ausreichender Evidenz (Winklmayr *et al.*, 2015).

Eine effektive Reduktion des Frakturrisikos durch Kombinationstherapie konnte nicht nur bei Patienten mit einer Osteoporose (*T-Score:* < – 2,5), sondern auch bei Patienten mit einer Osteopenie (*T-Score* = - 1 bis – 2,5) nachgewiesen werden (Cummings *et al.*, 1998, Siris *et al.*, 2008, Quandt *et al.*, 2005).

Eine medikamentöse Therapie mit Bisphosphonaten kann erwogen werden, wenn z. B. eine Glucocorticoidtherapie (z. B. Prednisolon ≥ 7,5 mg) für bereits drei Monate oder länger andauert. Ebenso wenn bei Therapiebeginn eine absehbare Länge von drei Monaten Glucocorticoidtherapie in Aussicht steht, wenn gleichzeitig ein *T-Score* von – 1,5 oder niedriger an Gesamtfemur, Femurhals oder Lendenwirbelsäule vorliegt und wenn niedrigtraumatische Wirbelkörperfrakturen oder multiple periphere Frakturen (≥ 3) vorliegen. Nach drei Monaten erfolgt eine Reevaluation. Eine Reduktion des vertebralen Frakturrisikos zeigen Bisphosphonate auch in sehr unterschiedlichen *T-Scores*. Bereits ab einem *T-Score* von ≤ – 1,5 kann diese Therapieform auch ohne vorangegangene Fraktur in Betracht gezogen werden. Eine Einschränkung in der Behandlung und ein möglicher Risikofaktor, der einen Therapieerfolg verringert, ist z. B. Diabetes mellitus Typ 1. Hier ist die medikamentöse Behandlung nur bis zu einem *T-Score* von max. – 2,0 zugelassen (Vestergaard *et al.*, 2011).

Weitere Faktoren, die mit Einschränkungen der medikamentösen Behandlung einhergehen, sind Immobilität, Epilepsie/Antiepileptika, Zöliakie, primärer Hyperparathyreoidismus, Aromatasehemmer und Wachstumshormonmangel. Für eine individuelle Auswahl der Medikamente sollten Neben- und Zusatzwirkungen, Kontraindikationen und Kosten abgewogen werden. Mögliche Medikamente für diese Patientengruppe mit einer

nachgewiesenen Osteoporose sind Alendronat, Bazedoxifen, Denosumab, Ibandromat, Östrogene und Raloxifen je nach Frakturort. Östrogene sollten bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose nur bei Unverträglichkeit oder Kontraindikationen gegen andere Osteoporosetherapeutika eingesetzt werden.

Bei Männern sind z. B. die Medikamente Alendronat, Risendronat und Zoledronat zur Therapie zugelassen. Insgesamt zeigt sich jedoch in Bezug auf die Effizienz einer Frakturreduktion ein geringerer Effekt als bei Frauen. Teriparatid als rekombinantes Parathormon-Fragment zeigte sich gegenüber Bisphosphonaten überlegen.

Die Therapeutika haben alle zusätzliche Wirkungen und auch unerwünschte Wirkungen, die eine Therapie für viele Patienten ausschließen. So geht sogar eine erhöhte Mortalität mit dem Medikament Zoledronat nach Femurfraktur einher (Eriksen *et al.*, 2009).

Es wurden atypische subtrochantäre und diaphysäre Femurfrakturen, Vorhofflimmern, Kieferknochennekrosen, Hypokalzämien und vermehrt Karzinome unter Bisphosphonattherapie berichtet (Black *et al.*, 2010, Loke *et al.*, 2009, Grbic *et al.*, 2008, Cardwell *et al.*, 2010).

Die Implantation von Endoprothesen und zusätzliche Gabe von Bisphosphonaten führte zu einer zweifach längeren Überlebensrate (Prieto-Alhambra *et al.*, 2011). Eine Kombinationstherapie von Medikamenten wie z. B. Teriparatid und Denosumab über einen Zeitraum von zwölf Monaten führte zu einem höheren Anstieg der Knochendichte im Vergleich zur Einzeltherapie (Tsai *et al.*, 2013).

Eine weiterer nicht-medikamentöser Therapieansatz, der in der Dachverband-Osteologie-Leitlinie (DVO-Leitlinie) von 2017 thematisiert wurde, ist z. B. eine frühestmögliche Mobilisierung nach stabilen Wirbelkörperfrakturen (Tsai *et al.*, 2013, Pfeifer *et al.*, 2004a).

Zudem seien Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Paracetamol, Metamizol und Opiate für die Behandlung von Frakturschmerzen potent (Longo *et al.*, 2012).

Wirbelsäulenaufrichtende Orthesen und physiotherapeutische Übungsprogramme sollen ebenfalls zur schnelleren Genesung helfen (Pfeifer et al., 2004a) (Newman et al., 2016).

Durch elektrische Feldtherapie, Elektrotherapie und Interferenzstrom kann möglicherweise eine Funktionsverbesserung nach multiplen Wirbelkörperfrakturen erreicht werden (Zambito *et al.*, 2007). Im Anschluss an das Frakturgeschehen und die Versorgung sollte eine ambulante oder stationäre Rehabilitation erfolgen, außerdem sollten Selbsthilfegruppen zur Unterstützung (Pfeifer *et al.*, 2004b) in Erwägung gezogen werden.

Eine operative Methode zeigt die Kyphoplastie durch relevante schmerzlindernde Wirkung im Vergleich zur konservativen Schmerztherapie (McGirt *et al.*, 2009). Diese operative

Therapieoption hat jedoch das Risiko einer asymptomatischen pulmonalen Zementembolie oder einer Leckage bei flüssigem Zement (Venmans *et al.*, 2010).
Zusammenfassend ist zu sagen, dass bisherige medikamentöse und auch nicht-medikamentöse Therapieoptionen eine Verbesserung der Knochendichte mit sich bringen können und bei Osteoporose und Osteopenie laut DVO-Leitlinie 2017 angewandt werden. Alle Therapieoptionen gehen jedoch mit Risiken und Nebenwirkungen einher und stellen für multimorbide Patienten zum Teil sogar eine Kontraindikation dar.

### 1.3.2. Therapieoptionen der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) auf humane Osteoblasten von älteren Patienten mit normwertiger Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose untersucht. Bei der Hyperbaren Oxygenierung atmet der Patient in einer speziellen Kammer 100 %-igen, reinen Sauerstoff ($O_2$) bei einem erhöhten Umgebungsdruck (hier 2,0 bar ü. N.) ein. Die HBO wird heute bereits in unterschiedlichen medizinischen Bereichen genutzt.
In der Wundheilung z. B. gibt die HBO neue Perspektiven auf. Durch den veränderten Druckeffekt kann $O_2$ besser gebunden werden und als lokal gelöster $O_2$ eine erhöhte Perfusion in den Zielkompartimenten bedingen. Durch den Druck wird bestimmt, wie Sauerstoff von dem Hämoglobin an das zweiwertige Eisenion des Häms im Erythrozyten gebunden wird und in der flüssigen Phase gelöst wird. Durch eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdruckes ($pO_2$) wird $O_2$ für den Körper besser verfügbar und transportierbar zum Zielorgan. Zudem können so auch andere Körperflüssigkeiten oder Gewebsbestandteile von der Behandlung profitieren, da dieser Druckeffekt sich nicht nur auf das Blut auswirkt. Weitergehend tritt eine Förderung der Wundheilung und somit Minimierung der Genesungszeit der Patienten durch die Behandlung mit der HBO ein. Ischämien werden durch den verbesserten Sauerstofftransport ausgeglichen (Kirby *et al.*, 2019).
Die HBO hat sich neben der Behandlung von chronischen Wunden ebenfalls in der Kieferorthopädie bei Kieferknochennekrosen in experimentellen Studien als erfolgreich herausgestellt. Nach Khan *et al.* liegen zur Behandlung von Kieferknochennekrosen mehrere allgemeiner Ansätze zur Linderung der Symptome durch z. B. optimale Mundhygiene, Beseitigung von Zahn- und Parodontalproblemen und systemische Antibiotika, jedoch auch eine Behandlung mit Teriparatid vor. Operationen mit Mukoperiostlappen oder Behandlungen in Verbindung mit Lasertherapie zeigten Erfolge. Eine ergänzende Therapie mit der hyperbaren Sauerstofftherapie in Kombination mit einer Operation zeigten erfolgreiche Ergebnisse im Sinne einer Einschränkung der Nekrose, benötigen nach Khan *et al.* jedoch weitergehende

Forschung (Khan, 2015). Auch in einem Abstract aus der plastischen Chirurgie von Smolle *et al.* konnte ein Effekt der HBO hervorgehoben werden. Untersucht wurden Verbrennungen bei Menschen mit einer *Total body surface area* (TBSA) von 35-80 %. Hier verringerte die HBO vor allem an den Extremitäten unter anderem Ödeme, Infektionen und das Bakterienwachstum (Smolle *et al.*, 2021).

Die HBO wird heute für unterschiedliche medizinische Bereiche als Therapieansatz genutzt und gilt z. B. als anerkannte Therapie bei der Dekompressionskrankheit von Tauchern (DCS). Zudem wurde sie zur Behandlung von Luftfahrtpersonal mit erhöhtem Umgebungsdruck als Therapieoption eingeführt. Bei beiden Patientengruppen reichert sich das Körpergewebe mit z. B. Stickstoff an, entsprechend dem erhöhten Partialdruck im Atemgas. Beim Auftauchen bzw. Absenken des Flugzeuges kann es dann zur intravasalen Bildung von Stickstoffbläschen kommen. Diese Gasbläschen verursachen dann Embolien in lebenswichtigen Organen (Francis, 2002). Das Boyle-Mariotte-Gesetz besagt, dass ein erhöhter Druck auf ein Gaspaket zu einer Verringerung des Volumens des Gaspaketes führt. Eine Verringerung des Druckes auf das Gaspaket wiederum führt zu einer Ausdehnung des Volumens. Die HBO wirkt im Sinne des Boyle-Mariotte-Gesetzes mit einem Überdruck, der zu einer mechanischen Kompression von gasgefüllten Hohlräumen führt. Auch das Gefäßsystem, welches die Gasbläschen in der Blutbahn befördert, gilt als gasgefüllter Hohlraum. Durch die Druckerhöhung der Umgebung kommt es zu einer Verringerung des Gasvolumens und des Durchmessers der einzelnen Gasbläschen, sodass eine Embolisation lebenswichtiger Organe verhindert wird (https://www.leifiphysik.de/waermelehre/allgemeines-gasgesetz/grundwissen/gesetz-von-boyle-und-mariotte, aufgerufen am 22.02.2024).

**Zusammenfassend hat die HBO fünf Behandlungsziele:**

Erstes Ziel ist es, nach dem Boyle-Mariotte'schen Gesetz eine Minimierung der Gasbläschengröße (z. B. des Stickstoffs bei der Taucherkrankheit) vorzunehmen. Das zweite Ziel ist es sekundäre Bläscheneffekte zu vermeiden. Das dritte Ziel ist eine Elimination des Gases im umliegenden Gewebe (bei der Dekompressionserkrankung z. B. Stickstoff) hervorzurufen. Das vierte Ziel ist es Inertgasatmung zu vermeiden. Das fünfte Ziel ist eine generelle Oxygenierung des von der Dekompression betroffenen Gewebes (Almeling, 1996).

### 1.3.3. Hyperbare Sauerstofftherapie und Osteoporose

Die Behandlung mit der HBO selbst findet in einer Überdruckkammer statt, bei der entweder ein einzelner Patient (*Monoplace*-Kammer) oder mehrere Patienten gleichzeitig (Mehrplatzkammern) therapiert werden können. In den *Monoplace*-Kammern wird der Sauerstoff direkt in die Kammer gegeben, in den Multiplatzkammern bekommen die Patienten diesen über eine Haube oder Maske. Behandlungszeiten und -abläufe können individuell an den einzelnen Patienten oder die Gruppe angepasst werden. Die effektive HBO-Behandlung dauert 90 min und je nach Wirkung bis 2,0 bar ü. N. (≈ 1,4 ata). Notfallmäßige Behandlungen können auch unter angepasst höherem Druck und zeitlich gesehen länger ablaufen (z. B. bei der Taucherkrankheit) (https://www.gtuem.org/hbo-therapie/sh-25.html, aufgerufen am 25.02.2024; (Kirby *et al.*, 2019)). Durch die HBO können gleichzeitig zwei unterschiedliche Effekte im Körper erzielt werden. Bei Raumtemperatur und normalem Umgebungsdruck ist die Luft aus ca. 21 % Sauerstoff und ca. 78 % Stickstoff zusammengesetzt, sodass der übliche Sauerstoffpartialdruck $PaO_2$ (in der arteriellen Blutgasanalyse) bei 75 – 100 mmHg liegt. Durch eine Einatmung des 100 %-igen Sauerstoffs über z. B. eine Gesichtsmaske kann der $PaO_2$ deutlich über 100 mmHg gesteigert und auch in Geweben gemessen werden ($PcTO_2$). Des Weiteren verändert die HBO Druckeffekte, die bestimmen, wie viel Sauerstoff vom Hämoglobin transportiert und im Blut gelöst wird. Bei normalem Druck ist die Menge an $O_2$, die in der Plasmaphase gelöst wird, sehr gering. Wenn der Druck nun im Körper steigt, wird eine größere Menge an $O_2$ im Blut löslich und somit für den Patienten zugänglich gemacht. Die HBO wirkt auch auf andere Körperflüssigkeiten, wie es z. B. beim sensorineuralem Hörverlust deutlich wurde, bei der Sauerstoff zu ischämischen Nervengeweben transportiert wird. Eine Kontraindikation der HBO-Therapie ist die kongestive Herzinsuffizienz, hier sollte zunächst ein Risikoprofil erstellt werden. Patienten mit einem nicht drainierten Pneumothorax sollten nicht in die HBO-Kammer gehen, da hieraus ein Spannungspneumothorax entstehen könnte (Kirby *et al.*, 2019). Untenstehend ist die HBO-Kammer des Labors der Orthopädie und Unfallchirurgie Düsseldorf zu sehen (Abb. 8).

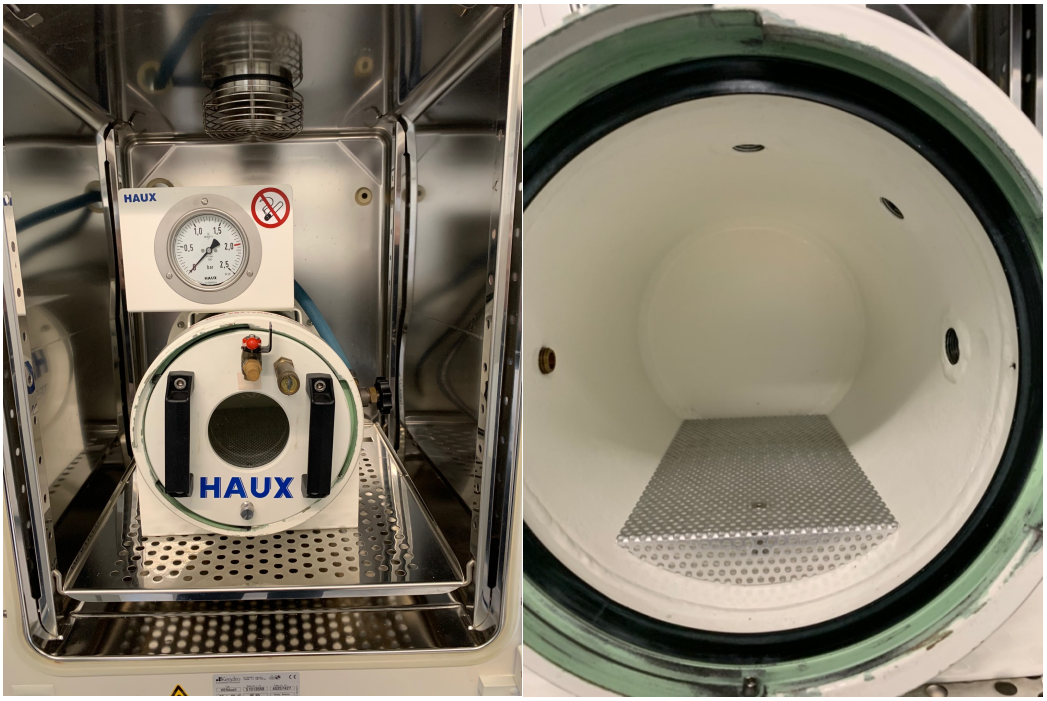



*Abbildung 8: HBO HAUX Labor UKD*

## 1.4. Fragestellung der Arbeit

Infolge der demographischen Entwicklung wird es zu einer weiteren Zunahme von Frakturen bei der Altersgruppe von vor allem älteren Patienten kommen. Die Knochenregeneration älterer Patienten ist im Vergleich zu jüngeren Patienten verlangsamt. Es kommt aufgrund von Verschleiß und multiplen Traumata zu vermehrten klinischen Versorgungsprozessen dieser Patienten. Erschwert wird die für die Patienten anstehende Therapie durch ein Ungleichgewicht des Knochenstoffwechsels zu Gunsten eines vermehrten Knochenabbaus durch die Osteoklasten.

Die HBO zeigt im klinischen Alltag bereits Anwendung, wie z. B. in der Behandlung von Kieferknochennekrosen im Fachgebiet der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und konnte hierbei eine positive Wirkung auf die Knochenregeneration demonstrieren (Beth-Tasdogan *et al.*, 2017). Bis dato fehlen Untersuchungen zur Behandlung der HBO von Osteoblasten älterer Patienten.

Da es bisher unterschiedliche Ergebnisse zu der Wirkung der HBO gibt und keine bisher bekannten Daten zur Verwendung der HBO bei Osteoporose, sollte dies geprüft werden. Welchen Einfluss die HBO auf die Osteogenese und die Osteoporose-relevanten Parameter von Osteoblasten älterer Patienten hat, ist also ein Ziel in der hier aufgeführten Arbeit.

Bei geminderter Knochendichte wurde die HBO bisher noch nicht untersucht.

Diese Lücke sollte die vorliegende Arbeit schließen. Genauere Kenntnisse über die Wirkung der HBO auf molekulare Mechanismen der osteogenen Differenzierung waren hier das Ziel. Für die medizinische Zukunft könnte dies ein bedeutender Schritt in Form neuer additiver und nebenwirkungsarmer Therapiemöglichkeiten sein, die positive Effekte auf die osteogene Differenzierung ausüben.

Ziel der Arbeit ist es, den Einfluss der HBO auf die osteogene Differenzierung und auf Osteoporose-relevante Parameter bei unterschiedlichen Knochendichtetypen zu überprüfen. Zudem wird untersucht, ob durch additive Behandlung mit einem Antioxidans (Katalase) ein synergistischer Effekt auf die osteogene Differenzierung und auf die Osteoporose-relevanten Parameter zu beobachten ist

# 2. Material

Die Experimente wurden im Labor für Orthopädie und Unfallchirurgie Düsseldorf im *Life Science Center* unter vorheriger Einarbeitung von erfahrenen medizinisch-technischen Angestellten/-innen und der Betreuerin der Promotion durchgeführt. Bei den Methoden handelt es sich um bereits im Labor etablierte Methoden, welche nach *Standard Operating Procedures* (SOPs) einheitlich verfahren. Die Experimente wurden alle eigenständig und nach bestem Wissen und Gewissen entsprechend der Guten Wissenschaftlichen Praxis durchgeführt. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank mit Abluft durchgeführt und bei Verdacht auf eine Kontamination der Osteoblasten wurden diese vom Versuch ausgeschlossen.

## 2.1. Verbrauchsgegenstände

| **Verbrauchsgegenstand** | **Hersteller** |
|---|---|
| Einwegskalpell | FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Japan |
| Einmalhandschuhe | (Micro-Touch® NitraTex®), Ansell GmbH, München. Deutschland |
| Falcon | 15 ml High-Claritiy Polypropylene Conical Tube, Corning Science México S.A. de C.V., Avenida Industrial del Norte S/N, Tamaulipas, Mexiko |
| Glasdeckplatte (Neubauer Zählkammer) | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Küvetten | Küvetten 100 x 4 x 45 mm, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland |
| Kryokonservierungsröhrchen | Bio-one Cryo.s® Einfrierröhrchen 2 ml TM, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Messzylinder | 50 ml, 100 ml und 500 ml, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Micro-Touch® Einmalhandschuhe | Nitra-Tex™, Ansell GmbH, München, Deutschland |
| Mikroreaktionsgefäß | Reaktionsgefäß 1,5 ml SafeSeal, Sarstedt AG & Co. KG, Nübrecht, Deutschland<br><br>Safe-Lock Tubes® 2,0 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Multipette-Pipetten | Combitips® advanced, Biopur® 100 - 5000µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Parafilm | Parafilm M IS Laboratory Film, 100 mm x 38 mm,LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal, Deutschland |
| Pasteurpipetten Glas | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Pasteurpipetten Plastik | 3 ml Makro, 150 mM, unsteril, Ratiolab GmbH, Dreireich, Deutschland |
| Petrischalen | CELLSTAR® Cell Culture Dishes, PS, 145/20 mm, vents, TC, steril, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Pipettenspitzen mit Filter | Ep Dualfilter T.I.P.S®<br>0,5 - 20 µl, 2 - 100 µl, 10 µl, 300 µl,<br>50 - 1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland<br><br>10-20 µl, 200 µl, 1000 µl , Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Softtubes PCR | PCR SoftTubes 0,2 ml farblos, Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland |
| Spritze zur Sterilfiltrierung | Injekt® 20 ml / Luer Solo, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland |
| Stripetten | Costar® 2 ml, 5 ml, 12 ml, 25 ml Shorty Stripette® Serological Pipets,<br>Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten<br><br>Cellstar®, Serological pipette, sterile, 5 ml,<br>10 ml, 25 ml, 50 ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen, Deutschland |
| Sterilfilter | Filtropur S 0,2, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland |
| Sterile Tücher | Präzisionswischtücher, KIMTECH Science®, Kimberly-Clark® Professional, Surrey, England<br><br>Satino prestige, WEPA Professional GmbH, Arnsberg, Deutschland |
| Zellkulturflaschen | CELLSTAR® Cell Culture Flask 75 $cm^2$,<br>175 $cm^2$ red filter cap, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Zellkulturplatten | 6-*Well*, 24-*Well*, 96-*Well*, CELLSTAR® Tissue Culture Plates, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Zellschaber | Zellspachtel 195 mm x 14 mm, Cell Spatula, TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz |
| 48-*Well*-Platte PCR | MicroAMP® Fast Optical 48-*Well-Rection Plate* (0,1 ml), applied biosystems®, life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika |
| 48-*Well*-Platte Folie | MicroAMP® 48-*Well* Optical Adhesive Film, life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika |

***Tabelle 1:*** *Verbrauchsgegenstände*

## 2.2. Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|---|
| Abzug | Waldner Laboreinrichtungen GmbH und Co. KG, Wangen im Allgäu, Deutschland |
| Autoklav | Autoklav DX-90, Systec GmbH, Osnabrück, Deutschland |
| Feinwaage | Extend ED Analytical Balance, 220 g x 0,1, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland |
| Gelelektrophoresekammer und Mini-Elektrophorese | Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland<br>VWR CAT 89032-290 Mini Electrophoresis 300 V, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Gelelektrophorese Imaging | ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland |
| HBO | HERAcell® Heraeus, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika (Inkubator)<br><br>HAUX Testkammer 103355215, EN 837-1, HAUX-LIFE-SUPPORT GmbH, Karlsbad-Ittersbach, Deutschland<br><br>Sauerstoffflasche 2,5, Linde GmbH, Gases Division, Pullach, Deutschland |
| Inkubator / Brutschrank | HERAcell® 150, 150i, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Kühlung (Gefrierschrank) | Liebherr Premium Gefrierschrank, Liebherr-Haushaltsgeräte GmbH, Ochhausen, Deutschland<br><br>HERAFreeze™ HDE Series, Ultratiefkühlschrank, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Kryo-Einfriergefäß | Cryo-Einfriergerät Mr. Frosty, Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen, Pressbaum, Österreich |
| Magnetrührer | RET Control/t IKAMAG® safty control, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland |
| Mikroskop | Zeiss Axiovert 40, 200 (ALZ), Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland<br><br>Zeiss Mikroskopkamera Axiocam MRC, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland |
| Multipette | Multipette® E3x, 1 µl – 50 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Multiplattenlesegerät | VICTOR3™ V Multilabel Counter Model 1420, Perkin Elmer, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Neubauer Zählkammer | LO Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland |

| | |
|---|---|
| PCR | Applied Biosystems, 7300 Real Time PCR System, life technologies™, Carlsbad, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika<br><br>StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| pH-Meter | HI2020 edge® Multiparameter-Tablet-Messgerät für pH, Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhrigen, Deutschland |
| Pipettboy | accu-jet® pro, BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf |
| Photometer | BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Reservoir für PCR | VWR Reagent Reservoirs, 100 ml, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Spektralphotometer | NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Sterile Unterlage (PCR) | Raucodrape®, Lohmann und Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland |
| Stickstofftank | Locator 4 Plus™ Gestell- und Boxensystem, 121 l, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Taumelrollenmischer | RS-TR05, 100 - 250 V, Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland |
| Tischsaugpumpe | KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland |
| Thermal Cycler (cDNA) | T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkrichen, Deutschland |
| Thermal Printer (zum Photometer zugehörig) | Thermal Printer DPU-414, SII Seiko Instruments Inc., Neu-Isenburg, Deutschland |
| ThermoStat plus (RNA) | ThermoStat plus 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Vortex Mixer | Vortex Mixer 7-2020, neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Wasserbad | Wasserbad WNB10, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland |
| Wasseraufbereiter | Purelab flex 1 Dispenser, EGLA LabWater, High Wycombe, England |
| Werkbank | HERAsafe®, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Zentrifuge, groß | Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland<br><br>Heraeus Megafuge 16 R, Thermo Electron Coprportion, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Zentrifuge, klein | Eppendorf Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

| | |
|---|---|
| | HERAEUS Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron Coprportion, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika<br>HERAEUS Pico 17 Minicentrifuge, Thermo Electron Coprportion, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika<br><br>Mico centrifuge, 6000 rpm, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

***Tabelle 2:*** *Geräte*

## 2.3. Chemikalien und Zusätze

| **Chemikalien** | **Hersteller** |
|---|---|
| Agarose | Agarose A9539-500G, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Alizarin-Rot-S | Alizarinrot-S Mononatriumsalz, 100 g, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| ß- Glycerophosphat | ß-Glycerophosphate disodium salt hydrate, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| CellTiter-Blue® | CellTiter-Blue® Reagent, 100 ml, Promega, Wallendorf, Deutschland |
| Cetylpyridiniumchlorid (CPC) | Cetylpyridinium choride monohydrate, 100 G, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Dexamethason (wasserlöslich) | Dexamethason D2915, 392,47 g/mol, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika<br>Finale Konzentation: 100 nM |
| Destilliertes Wasser | Ampuwa® Spüllösung, 1000 ml, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland |
| Ethanol | EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph EUR Ethanol absolut > 99,9 %, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland |
| FCS/FBS (Fetales Kälberserum) | PAA Laboratories GmbH; Cölbe, Deutschland |
| Gentamycin | Gentamycin 50 mg/ml, 20 ml, gibco, Life Technologies Limeted, Paiyley, England |
| $H_2O_2$ | Hydrogen peroxide solution, 500 ml, contains inhibitor, 30 wt. % in $H_2O$, ACS reagent, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Hände-Desinfektionsmittel | Sterilium® classic pure, 500 ml, Paul Hartmann AG, BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland |
| HCl | Hydrochloric acid, Titripur®, 1,000 l, 1 mol/l, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland |
| HEPES | HEPES solution, 1M, pH 7,0-7,6, steril filtriert, 100 ml, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |

| | |
|---|---|
| Katalase | Katalase from bovine liver 1000 - 40000 Units/ml Protein, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| L-Ascorbinsäure-2-Phosphat | L-ascorbic acid 2-phosphate sequimagnesium salt hydrate, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| 2-Mercaptoethanol | 2-Mercaptoethanol, 250 ml, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| NaOH | Sodium hydroxide, 5 mol/l, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland |
| NGS | Normal Goat Serum Blocking Solution, S-1000-20, 20 ml, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Nitrophenol | 4-Nitrophenol solution, 100 ml, 10 mM, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Paraformaldehyd 4 % | Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland |
| Kalibrierungspuffer | Pufferlösung<br>pH 7,00 +/- 0,02 und pH 4,005 +/- 0,02,<br>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| RNAse AWAY® 475 ml | Molecular BioProducts, Inc., San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika |
| RNAse-freies Wasser | Water for molecular biology, 125 ml, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| TAE Puffer | Tris-Acetat-EDTA-Puffer 50x, Tris-EDTA-Buffer solution, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, München, Deutschland |
| Trypsin | Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 % in PBS Solution, 10X, BioReagent,100 ml, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Trypanblau | Promega, Wallendorf, Deutschland |
| Wasser 20 ml | BioScience-Grade, Nuclease-frei und autoklaviert, DEPC-behandelt, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

***Tabelle 3:*** *Chemikalien und Zusätze*

## 2.4. Kits

| **Kit** | **Hersteller** |
|---|---|
| DNA-Ladepuffer, Fermentas & XMassRuler Loading Dye, R0621<br><br>DNA-Leiter (Ladder), Fermentas MassRuler Express DNA Ladder LR Forward, #SM1263 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 | R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA |

| | |
|---|---|
| Invitrogen DNA-free™ Kit DNAse Treatment & Removal<br>- Nuclease-Free Water 0,2 µm<br>- rDNAse I 120 µl<br>- DNase Inactivation Reagent 600 µl<br>- 10 X DNase I Buffer 600 µl | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Omniscript® RT Kit (200)<br>- Omniscript® RT 50 µl<br>- Buffer RT 150 µl<br>- RNAse-Free Water 1,9 ml<br>- dNTP-Mix 5 mM 100 µl<br>- Oligo dt Primer p/$dt_{15}$ for cDNA Synthesis 8 nmol | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland |
| QIAshredder (250) | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland |
| RNeasy® Mini Kit (250) | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland |
| PowerSYBR® Green, PCR Mastermix, 5 mL | Appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Thermo Scientific RiboLock RNAse Inhibitor 2500 U, 40 U/µl | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |
| SYBR Gold, Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel stain, 2261461 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika |

***Tabelle 4:*** *Kits*

## 2.5. Primer

| **Primer** | **Hersteller** |
|---|---|
| GAPDH | h-GAPDH-Reverse, 5´-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3', 285 µl, TE,<br>Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland<br><br>h-GAPDH-Forward, 5`-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G-3`, 266 µl<br>Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland |
| RANKL | Hs_TNFSF11_1_SG, QT00215614, QuantiTect® Primer Assay,<br>QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland |

***Tabelle 5:*** *Primer*

## 2.6. Medien und Lösungen

| **Medium / Lösung** | **Hersteller** |
|---|---|
| 0,5 % Alizarinrot-S-Lösung | 250 mg Alizarinrot-S mono Sodiumsalz + 50 ml destilliertes $H_2O$ |
| 4 % Cetylpyriniumcholrid- Lösung | 4 g CPC + 40 ml destilliertes $H_2O$ |
| 4 %-ige Paraformaldehyd-Lösung | 4 ml Paraformaldehyd + 40 ml PBS |
| 70 %-ige Ethanolmischung | 14 ml RNAse-freies Wasser + 6 ml 99%-iger Ethanol |
| α-Ascorbinsäure-2-phosphat | 80 mg + 5 ml destilliertes Wasser → 10 Portionen, 7,95 mg/ 500 ml OM-Medium |

| | |
|---|---|
| | Finale Konzentration: 50 µmol |
| ß-Glycerophosphat | 11 mg + 25 ml destilliertes Wasser → 10 Portionen, 1,08 g/500 ml OM-Medium<br>Finale Konzentration: 100 mM |
| Einfriermedium | Dimethylsulfoxide (DMSO) + 10 % FCS |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/L D-Glucose, + L-Glutamin, ohne Pyruvat) 500 ml, gibco, Life Technologies Europe B.V., Bleiswijk, Niederlande |
| DPBS | Dulbecco's phosphate buffered saline, ohne Kalziumchlorid und Magnesium, 500 ml, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika |
| Kollagenase-Typ-IV-Lösung | 40 ml Kultivierungsmedium + 100 mg Kollagenase, steril filtriert |
| Osteogenes Differenzierungsmedium | 500 ml DMEM<br>+ 10 % FCS<br>+ 5 ml Penicillin/Streptomycin<br>+ 5 ml HEPES<br>+ 500 µl Gentamycin<br>+ 10 nM Dexamethason<br>+ 100 nM ß-Glycerophosphat<br>+ 50 µM α-Ascorbinsäure-2-phosphat |
| Osteogenes Kultivierungsmedium | 500 ml DMEM<br>+ 10 % FCS<br>+ 5 ml Penicillin/Streptomycin<br>+ 5 ml HEPES<br>+ 500 µl Gentamycin |
| RLT-Puffer | 10 % ß-Mercaptoethanol in RLT |

***Tabelle 6:*** *Medien und Lösungen*

## 2.7. Zellen

| | |
|---|---|
| Osteoblasten | Primärkultur aus Hüftköpfen |
| (Genehmigung der Ethik-Kommission der Universität Düsseldorf, Studiennummer: 5585R) | |

***Tabelle 7:*** *Zellen*

## 2.8. Software

| **Verwendung** | **Software** |
|---|---|
| Literaturverwaltung | Endnote 20 |
| Mikroskopsoftware | Zeiss Axiovision Rel. 4.8<br>Zen Imaging Software, Zen 3.0 (blue edition), Carl Zeiss Microscopy GmbH |
| Photometrische Messung | Wallac 1420 Workstation |
| RNA Messung NanoDrop™ | NanoDrop™ 2000/2000c Operating Software, Version 1.6 |
| Statistische Auswertung | GraphPad Prism 5 |
| Tabellenverarbeitung | Microsoft Excel Version 16.52, 2021 |
| Textverarbeitung | Microsoft Word Version 16.50, 2021 |

***Tabelle 8:*** *Software*

# 3. Methodik

## 3.1. Patientenkollektiv

Die verwendeten Osteoblasten wurden aus Hüftköpfen isoliert, die im Rahmen von notwendigen Operationen Patienten der Orthopädie und Unfallchirurgie des Uniklinikums Düsseldorf entnommen wurden und sonst verworfen worden wären. Hierbei handelte es sich um Hüftköpfe, die nach vorheriger Einwilligung der Patienten und gemäß dem Ethikantrag Studiennummer: *5585R* dem Forschungslabor zur Verfügung gestellt worden sind. Insgesamt konnten Osteoblasten von 23 Donoren in den Versuchen verwendet werden, hierbei waren 18 Frauen und 5 Männer. Die Osteoblasten wurden in drei verschiedene Gruppen anhand einer DXA-Messung eingeteilt. In der Kontrollgruppe befanden sich insgesamt acht Spender (w = 6, Ø = 69,83 Jahre; m = 2, Ø = 67 Jahre), die eine normale Knochendichte aufwiesen (*T-Score*: ≥ - 1 g/cm$^2$). In der Osteopenie-Gruppe gab es sechs Spender (w = 5, Ø = 81,2 Jahre; m = 1, Ø = 82 Jahre) mit einer geminderten Knochendichte (*T-Score*: - 1 bis – 2,5 g/cm$^2$). Die Osteoporose-Gruppe setzte sich aus acht Spendern (w = 6, Ø = 81,67 Jahre; m = 2, Ø = 74 Jahre) mit einer stark verminderten Knochendichte zusammen (*T-Score*: ≤ – 2,5 g/cm$^2$).
Additiv wurden Osteoblasten von einem weiteren Donor für einen pH-Versuch zur Prüfung des HBO-Einflusses auf den pH-Gehalt des Mediums verwendet, weshalb er nicht Bestandteil der oben beschriebenen Gruppen war.

## 3.2. Zellkulturmethoden

### 3.2.1. Isolation von humanen Osteoblasten aus Hüftköpfen

Mithilfe eines scharfen Löffels wurde aus den Hüftköpfen die Spongiosa möglichst mittig entfernt und in Petrischalen gegeben. Hier war es wichtig, die Spongiosa von der Compacta und dem Bindegewebe zu trennen. Insgesamt wurden 4 - 5 g Spongiosa in 1 cm große Stücke geschnitten. Die gewonnene Spongiosa wurde mit 25 ml Kultivierungsmedium gewaschen. Die Kollagenase-Typ-IV-Lösung wurde erwärmt und folgend die gewaschenen Knochenfragmente in die Lösung überführt und bei 37 °C für 2,5 h auf einem Taumelroller im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand der Kollagenase-Spongiosa-Lösung vorsichtig abgenommen und bei 300 g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde mittels 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert, auf 50 ml aufgefüllt und wieder bei 300 g* für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen und das Zellpellet in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert.

Je zwei T75er Flaschen pro Spender wurden mit der pseudonymisierten Kennung, dem Datum, sowie der Passage (hier P0) versehen und mit je 15 ml Kultivierungsmedium gefüllt. In jede T75er Flasche wurden 2,5 ml der Zellsuspension zugefügt. Die Osteoblasten wurden dann in den Brutschrank bei *humidified atmosphere* mit 5 % $CO_2$ bei 37 °C inkubiert, danach erfolgte täglich eine mikroskopische Kontrolle.

### 3.2.2. Ansetzen des Kultivierungs- und des Differenzierungsmediums

Als Grundlage für beide Medien diente das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin und ohne Pyruvat (gibco). Beiden Medien wurden *HEPES solution,* Gentamycin (50 mg/ml), 10 % Fetales Rinderserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (P/S, 5 ml) zugesetzt. Mithilfe des Kultivierungsmediums wurde nun das Differenzierungsmedium (OM-Medium) hergestellt. Hierzu wurden zusätzlich 100 nM ß-Glycerophosphat, 50 µmol α-Ascorbinsäure-2-phosphat und 10 nM Dexamethason hinzugefügt.

### 3.2.3. Passagierung und Zellkulturpflege der Osteoblasten

Die Zellkulturpflege hat sowohl das regelmäßige Wechseln des Mediums als auch die Kontrolle unter dem Mikroskop beinhaltet. Die Osteoblasten wurden in Zellkulturflaschen T75er oder T175er kultiviert. Als Kultivierungsmedium wurde hierbei das *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* (DMEM) mit den Zusätzen (Punkt 3.2.2) verwendet. Das Medium wurde zweimal in der Woche ausgetauscht. Die Osteoblasten wurden während der Kultivierungszeit bei 37°C und 5 % $CO_2$ im Brutschrank inkubiert. Das verbrauchte Kultivierungsmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Nach Absaugen des DPBS und Zugabe von neuem Medium wurden die Zellen zurück in den Inkubator gegeben. Bei Erreichen der Konfluenz (meist nach 4 – 5 Tagen) wurden die Zellen abhängig von der Zellzahl 1:2 oder 1:3 gesplittet. Nach einem Waschschritt mit DPBS wurde zur Lösung der Zellen 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung im Verhältnis von 1:10 für 3 - 5 min auf die Zellen gegeben und diese im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Der Prozess des Detachments wurde unter dem Mikroskop beobachtet, durch Klopfen an der Flasche („*Shake-off-Methode*“) wurden weitere noch adhärente Zellen gelöst und letzte Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die enzymatische Trypsinreaktion wurde mit Hilfe der gleichen Menge Kultivierungsmedium gestoppt. Anschließend wurden die Osteoblasten für 5 min bei 300 g* zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit den

Osteoblasten mit 1 ml resuspendiert. Je nach Zellzahl und Versuchsanordnung wurden die Zellen auf die entsprechenden Zellkulturgefäße aufgeteilt.

### 3.2.4. Kryokonservierung von Osteoblasten

Zunächst wurde ein Kryokonservierungsmedium hergestellt, indem 9 ml vorgewärmtes FCS mit 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gemischt wurden. Die Osteoblasten wurden wie in 3.2.3 beschrieben trypsiniert, die Reaktion wurde gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde resuspendiert, in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, für 90 sek bei 450 g* erneut zentrifugiert und abgesaugt. Unter ständiger Durchmischung wurde das Kryokonservierungsmittel mit den Osteoblasten vermischt und in je ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) je 1 ml Medium mit Zellen gegeben. Die Osteoblasten in den Mikroreaktionsgefäßen wurden in eine Kryokonservierungsbox (*Mr. Frosty*) gestellt und anschließend bei - 80 °C eingefroren. Nach einigen Tagen erfolgte die Überführung in den Stickstofftank.

### 3.2.5. Auftauen von Osteoblasten

Das Kultivierungsmedium wurde auf 37 °C erwärmt. Die aus dem $N_2$-Tank entnommenen Osteoblasten wurden zügig aufgetaut und entsprechend der Zellzahl auf die Zellkulturflaschen aufgeteilt, wobei jeweils 1 x $10^6$ Zellen auf eine T75er pipettiert und in diese jeweils 20 ml Kultivierungsmedium vorgelegt wurden. Durch Schwenken wurden die Osteoblasten gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden dann bei 37 °C und 5 % $CO_2$ im Inkubator inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium erneuert.

### 3.2.6. Versuchsvorbereitung der Osteoblasten

Waren die Osteoblasten zu 80 % konfluent, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und 5 ml Trypsin-PBS-Lösung auf die Zellen gegeben und im Brutschrank für 3 - 5 min inkubiert. Danach wurden die Osteoblasten mikroskopiert und leicht geklopft. Mit der gleichen Menge Kultivierungsmedium wurde die Reaktion gestoppt und Zellsuspension bei 300 g* für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit 1 ml Kultivierungsmedium resuspendiert.

In einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl der resuspendierten Zellsuspension vermischt. Anschließend wurden ca. 5 - 6 µl des Gemisches in die Zählkammer

pipettiert, unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den vier einzelnen Quadranten gezählt und mit Hilfe der folgenden Rechnungen die Zellzahl/ml bestimmt:

$$\boldsymbol{Zellzahl\ (ml) = \left(\frac{Gezählte\ Zellen\ in\ 4\ Quadranten}{4}\right) x\ 2\ x\ 10^4}$$

/4 = Mittelwert der vier Quadranten

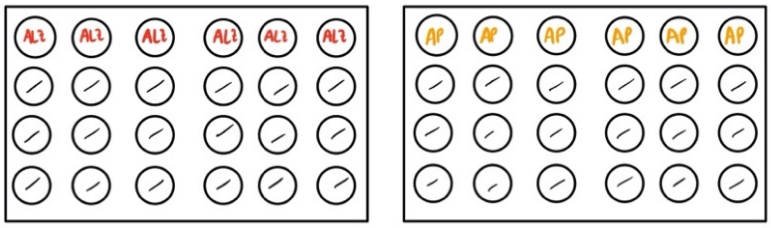
x 2 = Verdünnungsfaktor

x $10^4$ = Volumen in der Zählkammer 0,1 µl auf 1 ml berechnet

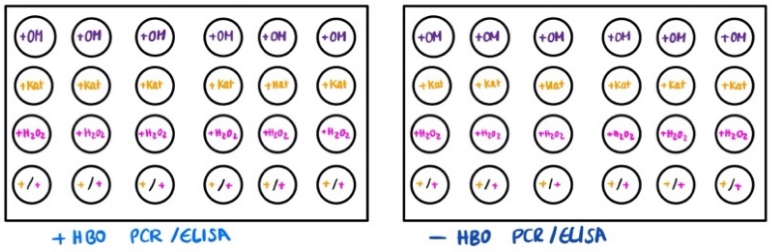
In einer T75 Flasche wurde die benötigte Menge Kultivierungsmedium mit der errechneten Menge der Osteoblasten vermengt, um diese anschließend auf die 24-*Well*-Platten in je 500 µl/*Well* zu pipettieren (Abb. 9). Für eine gleichmäßige Verteilung auf dem *Well*boden wurden die 24-*Well*-Platten unter dem Mikroskop begutachtet und durch eine Horizontal- und Vertikalbewegung verteilt. Zum Schluss wurden die Osteoblasten im Inkubator bei 37 °C und 5 % $CO_2$ inkubiert und es fand eine tägliche Kontrolle unter dem Mikroskop statt.

**Versuchsansatz**

Tag 0: 24-Well-Platten mit je 6 Wells




Tag 14: 24-Well-Platten mit je 24 Wells




Tag 21: 6 24-Well-Platten

**Legende**

+OM = OM-Medium (Osteogenes Differenzierungsmedium)
+Kat = OM-Medium + Katalase (125 U/ml Katalase)
$+H_2O_2$ = OM-Medium + $H_2O_2$ (50 µM $H_2O_2$)
+/+ = Om-Medium + Katalase + $H_2O_2$ (Verhältnis s.o.)
+/- HBO = mit / ohne HBO Behandlung
ALZ = AlizarinRot-S
AP = Alkalische Phosphatase

***Abbildung 9:*** *Versuchsansatz Aussäen Osteoblasten*

### 3.2.7. Hyperbare Sauerstofftherapie und osteogene Differenzierung

Hatten die Osteoblasten eine Konfluenz von 100 % erreicht, wurden sie mit Hilfe des osteogenen Differenzierungsmediums differenziert. Die Osteoblasten mit HBO-Behandlung wurden fünfmal in der Woche für 90 min bei 2,0 bar ü. N. und 100 % $O_2$ bei 37 °C in einem Brutschrank gewärmt. Die Kontrollgruppe wurde für diese Zeit im Inkubator belassen, hat

jedoch die gleiche Behandlung mit Medium (Mediumwechsel mit Differenzierungsmedium +/- Katalase und +/- $H_2O_2$) erhalten wie auch die Gruppe der HBO-Behandlung. Für die HBO-Behandlung wurden die Osteoblasten zunächst in die HBO-Kammer gestellt. Durch einen Drehmechanismus wurde die HBO wieder verschlossen und das zuführende $O_2$ durch ein Ventil geöffnet, sodass das Gas die HBO durchdringen und überschlüssige Raumluft in der Kammer erdrängen konnte. Durch einen Hebel wurde die Kammer anschließend nach außen luftdicht verschlossen und der Druck bis auf 2,0 bar ü. N. reguliert. Nach der HBO-Behandlung kamen die Osteoblasten in den Inkubator zurück. Ein Mediumwechsel erfolgte zweimal in der Woche mit Differenzierungsmedium (OM-Medium) und den jeweiligen Zusätzen (Abb. 9). Vorher wurde das verbrauchte Medium abgesaugt.

Wie folgt wurden die Osteoblasten mit den unterschiedlichen Medien versorgt:

| | |
|---|---|
| Erste horizontale *Wellreihe* (6 *Wells*) | OM-Medium je 0,5 ml/*Well* |
| Zweite horizontale *Wellreihe* (6 *Wells*) | OM-Medium + Katalase je 0,5 ml/*Well* |
| Dritte horizontale *Wellreihe* (6 *Wells*) | OM-Medium + $H_2O_2$ je 0,5 ml/*Well* |
| Vierte horizontale *Wellreihe* (6 Wells) | OM-Medium + Katalase + $H_2O_2$ je 0,5 ml/*Well* |

Hierbei wurden folgende Rechnungen herangezogen:

| | |
|---|---|
| 125 U/ml Katalase: | 50 µM $H_2O_2$: |
| 42 mg Protein/ml | 30 % Lösung: 8820 mM |
| 25279 U/mg Protein | 1:100 in Medium → 88200 µM |
| 25279 U/mg x 42 mg Protein/ml | 88200 µM / 50 µM |
| = 1.061.718 U/ml | = 1764 Verdünnungsfaktor (VF) |
| | |
| Soll/Haben | 50.000 µl / 1,764 VF = |
| = 125 U/ml/ 1.061.718 U/ml | 28,3 µl $H_2O_2$ (1:100) in 50 ml Medium |
| = 0,0001177 ml = 0,1177 µl/ml | → Ab Spender 15 wurde die $H_2O_2$ |
| Medium | Konzentration halbiert auf 14,25 µl / 50 |
| 50 ml OM-Medium | ml OM-Medium |
| → 5,88 µl Katalase | |

Anschließend wurde erneut mikroskopiert und die Osteoblasten wieder im Inkubator bei 37 °C und 5 % $CO_2$ inkubiert.

### 3.2.8. Einfluss der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) auf den pH-Wert

Mit Hilfe dieses Experiments sollte untersucht werden, ob die Änderung des pH-Wertes, der durch die Behandlung mit der HBO induziert wird, einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung hat. Dafür wurden jeweils 2 ml Medium/*Well* untersucht. Das Medium wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter den gleichen Bedingungen in die HBO-Kammer gegeben wie die Osteoblasten (90 min, 2,0 bar ü. N. bei 100 % $O_2$, 35,3 °C). Anschließend wurde mit einem pH-Meter (HI2020 edge®) der pH-Wert bestimmt. Das pH-Meter wurde vorher mittels Pufferlösungen kalibriert. Die Analyse des Mediums fand direkt nach der HBO-Behandlung statt, parallel erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes des Mediums, welches zuvor im Inkubator war. Die Mittelwerte wurden ermittelt und ein basisches Medium hergestellt, welches dem ermittelten pH-Wert von 8,4 entsprach.
Anschließend wurden Osteoblasten ausplattiert. Die Osteoblasten der ersten Versuchsreihe wurden mit OM und den Zusätzen +KAT/+$H_2O_2$/++ über 21 Tage mit zweimal wöchentlichem Mediumwechsel behandelt. Die Osteoblasten der zweiten Versuchsreihe wurden additiv mit der HBO behandelt. Die Osteoblasten der dritten Versuchsreihe wurden mit dem vorher ermittelten basischen osteogenen Differenzierungsmedium behandelt (mit NaOH bzw. HCl auf einen pH von 8,4 titriert).

### 3.2.9. Alizarinrot-S-Färbung zur Kalziumdetektion

Um die osteogene Differenzierung der Osteoblasten analysieren zu können, wurden diese am Tag 0 und Tag 21 mithilfe der Alizarinrot-S-Lösung gefärbt. Dies ist ein Farbstoff aus der Gruppe der Anthrachinone, welcher die Kalziumionen, die in die extrazelluläre Matrix von Osteoblasten eingelagert sind, anfärbt.
Nach dem Tag 0 und 21 wurde der Überstand abgenommen und die Osteoblasten mit DPBS gewaschen. Unter einem Abzug wurden die Osteoblasten mit je 500 µl vorher erwärmter 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und bei RT für 20 min inkubiert. Mithilfe einer Einmal-Pasteurpipette (Plastik) wurde der Überstand nach Inkubation abgenommen und mit *Aqua dest*. dreimal gewaschen.
0,5 ml/*Well* Alizarinrot-S-Lösung (0,5 %) wurde auf die Osteoblasten gegeben und 20 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % $CO_2$ inkubiert. Anschließend wurde die Alizarinrot-S-Lösung durch Ausschlagen über dem Waschbecken entfernt und so lange mit *Aqua dest.* gewaschen, bis die Lösung klar war. Unter dem Lichtmikroskop konnte die rot gefärbte Matrix visualisiert

werden. Die angefärbten Kalziumeinlagerungen korrespondierten hierbei mit dem Grad der osteogenen Differenzierung. Mithilfe des Durchlichtmikroskops *Zeiss Axiovert 200* und der *Zeiss Axiocam* konnten über die Programme *Zeiss Axiovision Rel. 4.8* und *Zen Imaging Software (Zen 3.0 blue edition)* Bilder in Echtzeit in einer 10-fachen Vergrößerung mit einem 100 µm Maßstabstabsbalken aufgenommen werden. Durch die Rücklösung des Alizarinrot-S mit Hilfe einer 10 % Cetylpyriniumchloridlösung (CPC) wurde die osteogene Differenzierung nach C. A. Gregory quantifiziert (Gregory *et al.*, 2004).

0,5 ml CPC/*Well* wurde auf die Osteoblasten gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Mit Hilfe des Eppendorf Biophotometer plus wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von *lambda* = 600 nm (*Optical Density* 600 nm, $OD_{600}$) bestimmt. Zunächst wurde ein Blank mit 500 µl reiner CPC-Lösung gemessen, damit der Blank abgezogen werden konnte. Bei einer optischen Dichte über dem Wert 1 wurde eine Verdünnung von 1:10 mit *Aqua dest.*, angewandt. Der Verdünnungsfaktor wurde einberechnet.

### 3.2.10. Bestimmung der Zellzahl mittels CellTiterBlue®-Assay

Das *CellTiterBlue®-Assay* ist ein Test zur Analyse der Zellviabilität und lässt Rückschlüsse auf die Zellzahl zu, indem vitale Zellen den Redoxfarbstoff Resazurin in Resorufin reduzieren. Der zunächst blaue Farbstoff wird als pH-Indikator irreversibel umgewandelt und diese emittierte Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von 573 nm kann photometrisch analysiert werden. Das *CellTiterBlue®-Assay* wurde an den Tagen 0 und 21 angewendet. Zunächst wurde das *CellTiterBlue®* (CTB) auf 37 °C erwärmt und mit dem Kultivierungsmedium in einem Verhältnis von 1:20 gemischt. Der Überstand wurde abgenommen, die Osteoblasten mit DPBS gewaschen und anschließend jeweils 500 µl CTB/*Well* auf die Osteoblasten gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C und 5 % $CO_2$ wurde der Überstand in eine *96-Well*-Platte überführt (100 µl/*Well*) und bei $\lambda$ = 560 nm im Photometer *VICTOR3TM V Multilabel Counter Model 1420 (Perkin Elmer)* gemessen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, aus der später ein Mittelwert gebildet wurde. Ebenfalls wurde der *Blank* mitgeführt und von allen Werten subtrahiert. Nach der Messung wurde das CTB von den Osteoblasten abgenommen, diese mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl OM-Medium/*Well* inkubiert. Die Osteoblasten kamen für 1h in den Inkubator, bevor das *Alkalische Phosphatase-Assay* durchgeführt werden konnte. Der Tag 0 wurde von den Messwerten an Tag 21 abgezogen.

#### 3.2.11. Durchführung des Alkalischen Phosphatase-Assays

Osteoblasten exprimieren die Alkalische Phosphatase (AP) bei Aktivität. Nachdem das *CellTiterBlue®-Assay* an Tag 0 und 21 durchgeführt und die Osteoblasten für 1 h bei 37 °C und 5 % $CO_2$ inkubiert wurden, wurde zunächst das 4-Nitrophenol auf RT gebracht. Der Überstand wurde abgesaugt und die Osteoblasten mit DPBS gewaschen. Pro *Well* wurden 250 µl 4-Nitrophenol-Solution zugegeben, auch ein *Blank* wurde mitgeführt. Bei RT wurden die Osteoblasten für 15 min dunkel gelagert. Anschließend wurden je 100 µl in Doppelbestimmung im Photometer *VICTOR3TM V Multilabel Counter Model 1420 (Perkin Elmer)* bei $\lambda = 405$ nm Wellenlänge gemessen. Falls es nötig war, wurden die Überstände 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt. Der Tag 0 wurde von den entsprechenden Messwerten an Tag 21 abgezogen.

## 3.3. Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1. RNA-Isolation aus Osteoblasten mit Hilfe des RNA-Easy-Mini-Kits (QIAshredder, QIAGEN GmbH)

Um die RNA der Osteoblasten an Tag 0, 14 und 21 zu isolieren, wurde das Medium abgesaugt. Pro *Well* wurden 100 µl Trypsin-Lösung (10 % Trypsin in PBS) zugegeben und für 3 - 5 min bei 37 °C inkubiert und mit 100 µl Kultivierungsmedium gestoppt. Zusätzlich wurde ein Zellschaber verwendet. Die gelöste Zellsuspension wurde 90 sek bei 450 g* zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in einem Eisbad gekühlt. Danach wurden die Osteoblasten mit jeweils 350 µl RLT-Puffer (10% ß-Mercaptoethanol in RLT gelöst) resuspendiert und wieder auf Eis gestellt. Nach den Angaben des Herstellers wurde die RNA-Isolation durchgeführt, hierfür dienten als Puffer RLT, RW1, RPE und Buffer (Puffer von QIAGEN GmbH).

Die in RLT-Puffer lysierten Osteoblasten wurden im Vortex-Laborschüttler durchmischt, das Lysat auf den *QIAShredder* pipettiert und für 2 min bei 300 g* zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und das verbliebene Eluat im *Collection Tube* mit je 350 µl 70 %-igem Ethanol gelöst. Die nun gewonnene Lösung der einzelnen *Collection Tubes* wurde auf die Membran der *RNeasy* Mini-Säulen gegeben und 1 min bei 300 g* zentrifugiert. Das Eluat im *Collection Tube* wurde verworfen und je 700 µl RW1 wurden auf die *RNeasy* Mini-Säulen gegeben und wieder bei 300 g* für 30 sek zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und pro Säule 500 µl RPE zugegeben. Danach wurde wiederum für 30 sek bei 300 g* zentrifugiert, und der eben beschriebene Schritt einmal wiederholt, sowie für 2 min zentrifugiert. Die *Collection*

*Tubes* wurden entfernt und ein neuer *Collection Tube* unter jeder Membran angebracht. Erneute Zentrifugation für 1 min bei 300 g*. Ein weiteres Mikroreaktionsgefäß mit 2 ml RNAse-freiem $H_2O$ wurde vorbereitet. Die *Collection Tubes* wurden gegen die vorbereiteten Mikroreaktionsgefäße getauscht und 20 µl RNAse-freies Wasser wurde auf jede Membran gegeben, sowie 5 min inkubiert. Nach den 5 min Inkubationszeit wurden die Proben bei 300 g* für 1 min zentrifugiert und das Eluat erneut auf die Membran aufgetragen. Nochmals wurde bei 300 g* für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Silikatmembran verworfen. Folgend wurde in jedes Mikroreaktionsgefäß 2 µl *Buffer* und 1 µl rDNAse I zugefügt und dieses sofort wieder gekühlt. Die Mikroreaktionsgefäße wurden bei 37 °C für 30 min im Thermostat plus erwärmt. Anschließend wurden je 2 µl RNAse *Inactivation Reagent* zugefügt und für 2 min inkubiert. Nun wurde die Lösung bei 450 g* für 1,5 min zentrifugiert und der Überstand überführt. In dem Überstand war nun nur die RNA enthalten. Die Lösung wurde auf Eis gekühlt. Nachfolgend wurde eine Bestimmung der RNA-Konzentration vorgenommen.

### 3.3.2. Bestimmung der RNA-Konzentrationen

Das Spektralphotometer (NanoDrop™ 2000) wurde zunächst kalibriert, indem 2 µl RNAse-freies Wasser (*Water for molecular biology*) auf den Messpunkt aufgetragen wurde. Danach folgte eine Schließung des Hebelarms und das Programm (*Nandors™ 2000/2000c Operating Software*, Version 1.6) wurde ausgewählt. Darüber hinaus ergibt das Programm über einen Quotienten Aufschluss über die Qualität der RNA. RNA mit einem Quotienten unter 0,8 wurde nicht genutzt. Zunächst wurde der *Blank* gemessen, der Messfühler wurde anschließend mit einem staubfreien Tuch (Präzisionswischtücher) gereinigt und 1 µl jeder RNA nach dem Mischen im Vortex nacheinander auf den Messfühler aufgetragen. Die Messung erfolgte mit geschlossenem Hebel.
Die übrig gebliebene RNA wurde im - 81 °C Gefrierschrank eingefroren oder direkt in cDNA umgeschrieben.

### 3.3.3. Reverse Transkription der RNA der Osteoblasten

Die Reverse Transkription erfolgte, um aus RNA cDNA zu transkribieren. Hierbei wurde zunächst in der bereits angelegten EXCEL-Tabelle mit den RNA-Werten in ng/µl zusätzlich der umgeschriebene cDNA-Wert bei 50 ng in 1 µl ermittelt. Folgende Formel wurde hierbei angewandt:

$$cDNA = (50\,ng/\mu l\,/\,RNA) * 10\,\mu l\,Vol$$

Es sollten insgesamt 500 ng RNA in 10 µl verwendet werden. Bei Bedarf wurde das Volumen mit RNAse-freiem $H_2O$ bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt.
Zunächst wurde das *Omniscript RT Kit 200* (QIAGEN GmbH) mit Oligo dt, dNTP (5 mmol), RT-Puffer und das RNAse-freie Wasser auf Eis gelagert. Dann wurde die entsprechende Menge RNA in die PCR *SoftTubes* gefüllt. Nun wurde der *Mastermix* angesetzt, welcher aus 4,5 µl RNAse-freiem Wasser, 2 µl 10x RT-Puffer, 2 µl dNTP Mix (je 5 mM) und 1 µl Oligo dT (20 µM) bestand. Der *Mastermix* wurde pipettiert, gemischt im Vortex und anschließend die Enzyme, 0,25 µl Omniscript RT (4 U/µl) und 0,25 µl *RiboLock RNAse Inhibitor* (40 U/µl) zum *Mastermix* hinzugegeben und auf Eis gearbeitet. Auf jede vorbereitete RNA-Mischung wurden nun 10 µl von dem *Mastermix* pipettiert, anschließend gevortext und bei 300 g* 90 sek zentrifugiert. Als letztes wurden die Proben in den *T100™ Thermal Cycler* gegeben, das Menü RT PCR 37 °C ausgewählt und für 1 h inkubiert, um danach bei – 20°C gekühlt oder direkt weiterverwendet zu werden.

### 3.3.4. Analyse der RANKL-Genexpression mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction

Bei der Vorbereitung wurde zunächst ein Mastermix aus *PowerSYBR®-Green*, RNAse-freiem Wasser und den *Primern* RANKL (Hs_TNFSF11_1_SG, Sequenz: QT00215614) bzw. GAPDH (h-GAPDH-*Reverse Sequenz*: 5′-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3', h-GAPDH-*Forward Sequenz*: 5`-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G-3) hergestellt.

**PCR Spender X Tag 21**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | GAPDH (NTC) | GAPDH (NTC) | RANKL (NTC) | RANKL (NTC) | | | | |
| B | Spender X Tag 21 +HBO +OM RANKL | Spender X Tag 21 +HBO +OM RANKL | Spender X Tag 21 +HBO +KAT RANKL | Spender X Tag 21 +HBO +KAT RANKL | Spender X Tag 21 +HBO +$H_2O_2$ RANKL | Spender X Tag 21 +HBO +$H_2O_2$ RANKL | Spender X Tag 21 +HBO ++ RANKL | Spender X Tag 21 +HBO ++ RANKL |
| C | Spender X Tag 21 -HBO +OM RANKL | Spender X Tag 21 -HBO +OM RANKL | Spender X Tag 21 -HBO +KAT RANKL | Spender X Tag 21 -HBO +KAT RANKL | Spender X Tag 21 -HBO +$H_2O_2$ RANKL | Spender X Tag 21 -HBO +$H_2O_2$ RANKL | Spender X Tag 21 -HBO ++ RANKL | Spender X Tag 21 -HBO ++ RANKL |
| D | Spender X Tag 21 +HBO +OM GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO +OM GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO +KAT GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO +KAT GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO +$H_2O_2$ GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO +$H_2O_2$ GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO ++ GAPDH | Spender X Tag 21 +HBO ++ GAPDH |
| E | Spender X Tag 21 -HBO +OM GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO +OM GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO +KAT GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO +KAT GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO +$H_2O_2$ GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO +$H_2O_2$ GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO ++ GAPDH | Spender X Tag 21 -HBO ++ GAPDH |
| F | Spender X Tag 0 RANKL | Spender X Tag 0 GAPDH | | | | | | |
| | | | | | | | | |

**Je Spender:**

| **MM für 35 x 25 µL** | **(+1 Reaktion)** |
|---|---|
| 12,5 µL Mastermix | 437,5 µl |
| 1,0 µl GAPDH/RANKL | 35 µl |
| 10,5 µL H2O | 367,5 µl |

**+ je 1,0 µL Primer forward+reverse**

| **MM für 5 x 25 µL NTC** | **(+1 Reaktion)** |
|---|---|
| 12,5 µL Mastermix | 62,5 µL |
| 11,5 µL H2O | 57,5 µL |

**+ je 1,0 µL Primer forward+reverse**

**Legende:** MM = Mastermix , NTC = No template control

***Abbildung 10:*** *Pipettierschema PCR GAPDH und RANKL*

Nach dem Pipettierschema in Abb. 10 wurden zunächst entweder die RANKL-Primer oder als *Housekeeping*-Gen (konstitutiv exprimiertes Gen) das Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) vorgelegt. Danach wurde mit den jeweiligen NTCs (*No-Template*-Kontrollen) für RANKL bzw. GAPDH in der ersten Zeile eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die NTCs wurden mit je 12,5 µl *SYBR Green* und 11,5 µl RNAse-freiem Wasser angesetzt. In jedes *NTC-Well* wurden 25 µl des *Mastermixes* (PowerSYBR® Green, PCR Mastermix) und anschließend 1 µl der jeweiligen *Primer forward* und *reverse* pipettiert. Nach dem Pipettierschema wurde nun die cDNA pipettiert und mit dem *Mastermix* aufgefüllt. Der *Mastermix* setzte sich hierbei aus je 12,5 µl *SYBR Green*, 1,0 µl RANKL-*Primer* oder GAPDH und 10,5 µl RNAse-freiem Wasser zusammen. Anschließend wurde die Platte mit einer *MikroAMP®-48-Well*-Folie luftdicht verschlossen und in der Zentrifuge bei 300 g* für 20 sek zentrifugiert, um Luftbläschen zu entfernen und die Lösung zu mischen. Die Platte wurde anschließend im Eisbecken kühl gelagert und die Voreinstellungen am PCR-Gerät getätigt. Bei der *StepOne Software* wurde *Design Wizzard* angewählt. Anschließend wurde die 48-*Well*-Platte ausgewählt, die *Quantification*, Comp CT ΔΔ CT, der *Mastermix* mit *SYBR Green* und die Standardeinstellung von 2 h Zeit gewählt. Standardeinstellungen: *Holding Stage* 1 x (2 min bei 50 °C, dann 10 min bei 95 °C), *Cycling Stage* 40 x (15 sek bei 95 °C, 1 min bei 60 °C), *Melt Curve Stage* (15 sek bei 95 °C, 1 min bei 60 °C, 15 sek bei 95 °C). Die cDNA wurde ausgewählt, sowie die Proben, die als NTC auf der Platte sind (GAPDH/RANKL). Die Anzahl der Proben wurde angegeben. Die Dubletten und die Proben wurden im Programm beschriftet.

Anschließend wurde bei der Erstellung noch ein Erwärmungsschritt vor die Voreinstellung gesetzt (Erwärmungsschritt = *Holding Stage* 1 x 2 min bei 50 °C, siehe oben). Anschließend wurde die vorbereitete *MicroAMP®-48-Well*-Platte in das PCR-Gerät eingelegt. Der Test wurde gestartet. Anschließend erfolgte die Entnahme der Platte und die Auswertung der Ergebnisse.

### 3.3.5. Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Amplifikatlänge

Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel mit 1,8 g Agarose und 100 ml TAE-Puffer gegossen. Diese Substanzen wurden zunächst vermischt und anschließend in einem Messzylinder für 1 min bei 600 W in der Mikrowelle erwärmt, geschwenkt und erneut erwärmt. Es wurde kurzzeitig abgekühlt und anschließend in eine vorbereitete Elektrophoresekammer mit Kamm gegossen, sowie Luftblasen mit einem Stab ausgestrichen und 30 min ausgehärtet. Je 2 µl von dem PCR-Produkt wurden mit jeweils 4 µl vom *Loading Dye* gemischt. In ein separates 2 ml Reaktionsgefäß wurde ebenfalls 4 µl *Loading Dye* und zusätzlich 5 µl *Ladder* gegeben. Alle Proben wurden bei 300 g* 30 sek zentrifugiert und anschließend je 2,5 µl *Syber Gold* dazu pipettiert. Das gehärtete Gel wurde nun aus der Kammer entfernt, die Kammer mit TAE-Puffer gefüllt und das Gel eingelegt. In die erste Tasche kamen 10 µl *Loading Dye* und *Ladder* (*Mastermix*). Je 20 µl der Proben wurden anschließend in die Taschen pipettiert. Der Deckel auf der Kammer wurde geschlossen und der Stromfluss gestartet. Während des Prozesses sollte das Gel möglichst dunkel abgedeckt werden. Nach ca. 30 - 45 min wurde der Durchlauf gestoppt. Zum Scannen wurde das Gel aus der Kammer entfernt und auf die Fläche des Gelelektrophorese-Geldokumentationssystem *ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories* GmbH gelegt. Das Programm *Nucleid Acid* wurde ausgewählt. Anschließend konnte man mithilfe des Größenstandards genau sehen, ob die Primer ihren Angaben nach ein Genprodukt mit der richtigen Größe amplifiziert haben.

## 3.4. Proteinbiochemische Methoden

### 3.4.1. Durchführung des OPG-ELISA

Osteoprotegerin wird von den Osteoblasten sezerniert. Deswegen eignet sich hier die qualitative und quantitative Proteinbestimmung des Osteoprotegerins (OPG) mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Der *DuoSet Ancillary Reagent Kit 2* (R&D Systems, USA) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine 96-*Well*-Mikrotiterplatte wurde über

Nacht mit dem gelöstem *Capture Antibody* (*Capture* Antikörper (AK), 2 µg/ml, je 100 µl/*Well*) bei RT benetzt. Am nächsten Tag wurde die benetzte 96-*Well*-Platte mit dem Waschpuffer dreimal gewaschen (20 ml *Wash Buffer* in 480 ml *Aqua dest.* gelöst, Verhältnis 1:50, 300 µl/*Well*) und anschließend mit *Reagent Diluent* (5 ml *Reagent Diluent* in 45 ml *Aqua dest.* gelöst, 300 µl/*Well*) geblockt und für 1 h dunkel bei RT inkubiert. Die 96-*Well*-Platte wurde erneut mit dem Waschpuffer dreimal mit je 300 µl/*Well* gewaschen. Anschließend wurde der Standard inklusive *Blank* angesetzt. Der AK-Standard (Standard, 62,5 - 4000 pg/ml, je 500 µl in *Reagent Diluent*) wurde in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen vorbereitet und anschließend auf die 96-*Well*-Platte mit 100 µl/*Well* aufgebracht. Währenddessen wurden die Überstände, welche an Tag 0 und Tag 21 abgenommen wurden, schonend aufgetaut. Die Überstände wurden auf einer separaten 96-*Well*-Verdünnungsplatte 1:5 verdünnt (50 µl Probe mit 200 µl *Reagent Diluent*), als Dubletten auf der benetzten Platte aufgetragen (100 µl/*Well*) und anschließend kurz inkubiert. Ebenfalls wurde der AK-Standard der Konzentration aufsteigend von *Blank* bis 4000 pg/ml auf die benetzte Platte pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 2 h bei RT dunkel inkubiert und danach dreimalig mit Waschpuffer gewaschen. Der Detektionsantikörper wurde 15 min vor Inkubationsende angesetzt (*Detection* AK, 200 ng/ml, 61,1 µl in 11 ml RD und 220 µl *Normal Goat Serum* (NGS)), je 100 µl/*Well* aufgetragen und 2 h inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach der Inkubation wurde die Streptavidin-Mischung angesetzt (Streptavidin-HRP A, 1:200, 55 µl in 11 µl RD), 100 µl/*Well* aufgetragen und 20 min inkubiert. Dann wurde die Platte dreimal gewaschen. Der *Color Reagent Mix* wurde 15 min vor Gebrauch angesetzt (1:1, 6 ml *Colorreagent-A* und 6 ml *Colorreagent-B*, lichtgeschützt) und je 100 µl pro *Well* aufgetragen. Die Platte wurde maximal 20 min im Dunkeln inkubiert, bis bei dem Standard ein Farbumschlag sichtbar wurde. Anschließend wurden 50 µl *Stop Soltution* (2 N $H_2SO_4$) in die entsprechenden *Well*s gegeben und direkt im Plattenlesegerät *VICTOR3TM V Multilabel Counter Model 1420 (Perkin Elmer)* im *Shortcut* Programm die Absorption gemessen.

## 3.5. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe des Programms *Graphpad Prism 5* durchgeführt. Um die Signifikanz der Ergebnisse der verschiedenen Experimente zu prüfen, wurde eine zweizeitige Anova-Testung durchgeführt bei Normalverteilung des *t*-Tests. Bei einem p-Wert von $\leq 0{,}05$ galt das Ergebnis als signifikant und wurde jeweils mit einem Stern gekennzeichnet.

# 4. Ergebnisse

In der Arbeit sollte der Einfluss der Hyperbaren Sauerstofftherapie und des Antioxidans Katalase auf die osteogene Differenzierung und Osteoporose-relevante Parameter in Osteoblasten älterer Patienten unterschiedlicher Knochendichte untersucht werden. Hierfür wurden die Osteoblasten der drei verschiedenen Spendergruppen (normwertige Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose) jeweils in Kultur mit vier verschiedenen Behandlungen (OM, +KAT, $+H_2O_2$, $+KAT+H_2O_2$) gebracht und anschließend für 5 Tage / Woche an 21 Tagen für 90 min bei 2,0 bar ü. N. bei 35,3 °C und mit 100 % reinem $O_2$ behandelt. Im Anschluss wurde die Fähigkeit der Kalzifizierung, sowie die OPG- und RANKL-Expression analysiert.

Für alle folgenden Abbildungen gelten die Abkürzungen und Konzentrationen:

OM = Osteogenes Differenzierungsmedium

KAT = Katalase 125 U/ml

$H_2O_2$ = Wasserstoffperoxid 50 µmol

++ = Katalase 125 U/ml + Wasserstoffperoxid 50 µmol

## 4.1. Einfluss der HBO und der Katalase auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten

Um das osteogene Differenzierungspotenzial der Osteoblasten qualifizieren und quantifizieren zu können, wurde u. a. deren Fähigkeit, Kalzium in die EZM einzulagern, mittels Alizarin-Rot-S herangezogen. Die aktiven Osteoblasten bilden extrazelluläre Matrixproteine (Kollagen, Decorin, Osteocalcin), in die das Kalziumphosphat eingelagert wird. Das Alizarinrot-S färbt die Kalziumionen an (Abb. 11).

Nach Färbung und lichtmikroskopischer Dokumentation folgte die Rücklösung mit CPC und eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von *lambda* = 600 nm.

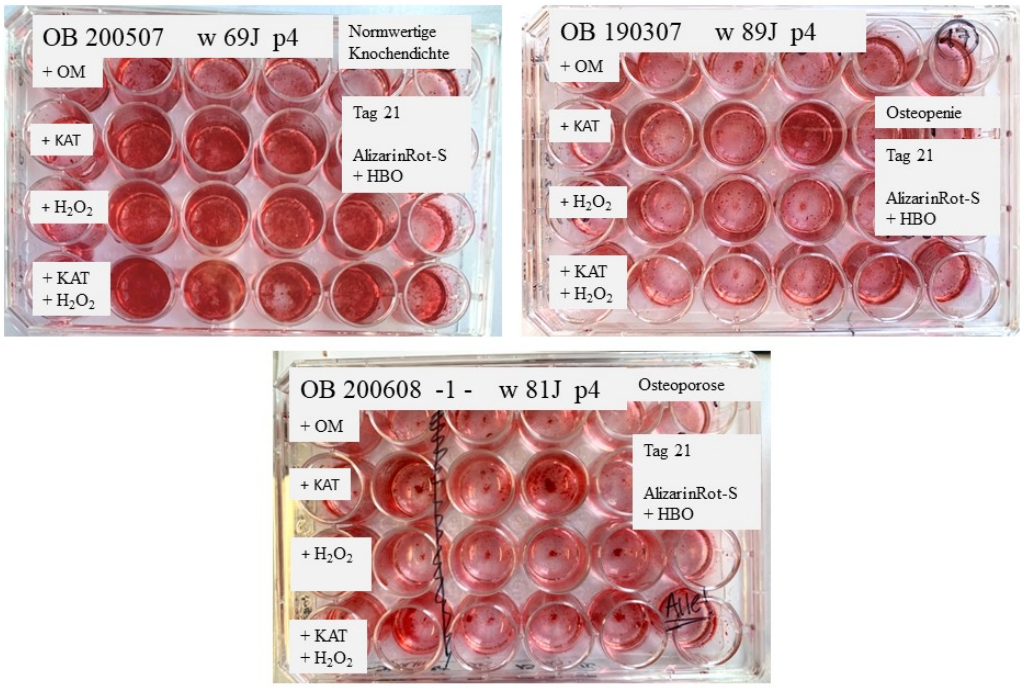



***Abbildung 11:*** *Übersichtsaufnahme Alizarinrot-S Färbung Tag 21 gesunde Osteoblasten (links), osteopenische Osteoblasten (rechts), osteoporotische Osteoblasten (unten), Fotografie*

Untenstehend wurde der Vergleich der osteogenen Differenzierung rein lichtmikroskopisch an Tag 21 deutlich durch die dunkelrote Anfärbung der extrazellulären Matrix festgehalten. Ebenfalls wurden hier Rückschlüsse auf die Behandlung mit und ohne die HBO gezogen. Jeweils auf den Bildern zu sehen ist links Tag 0, in der Mitte Tag 21 ohne HBO und rechts Tag 21 mit HBO-Behandlung (Abb. 12).

In Abb. 12 ist der Einfluss der HBO-Behandlung ohne additive Behandlung mit Katalase visualisiert. In allen drei Versuchsgruppen nach 21 Tagen zeigte sich eine osteogene Differenzierung. Dieser Effekt ließ sich durch die additive Behandlung mit der HBO steigern.

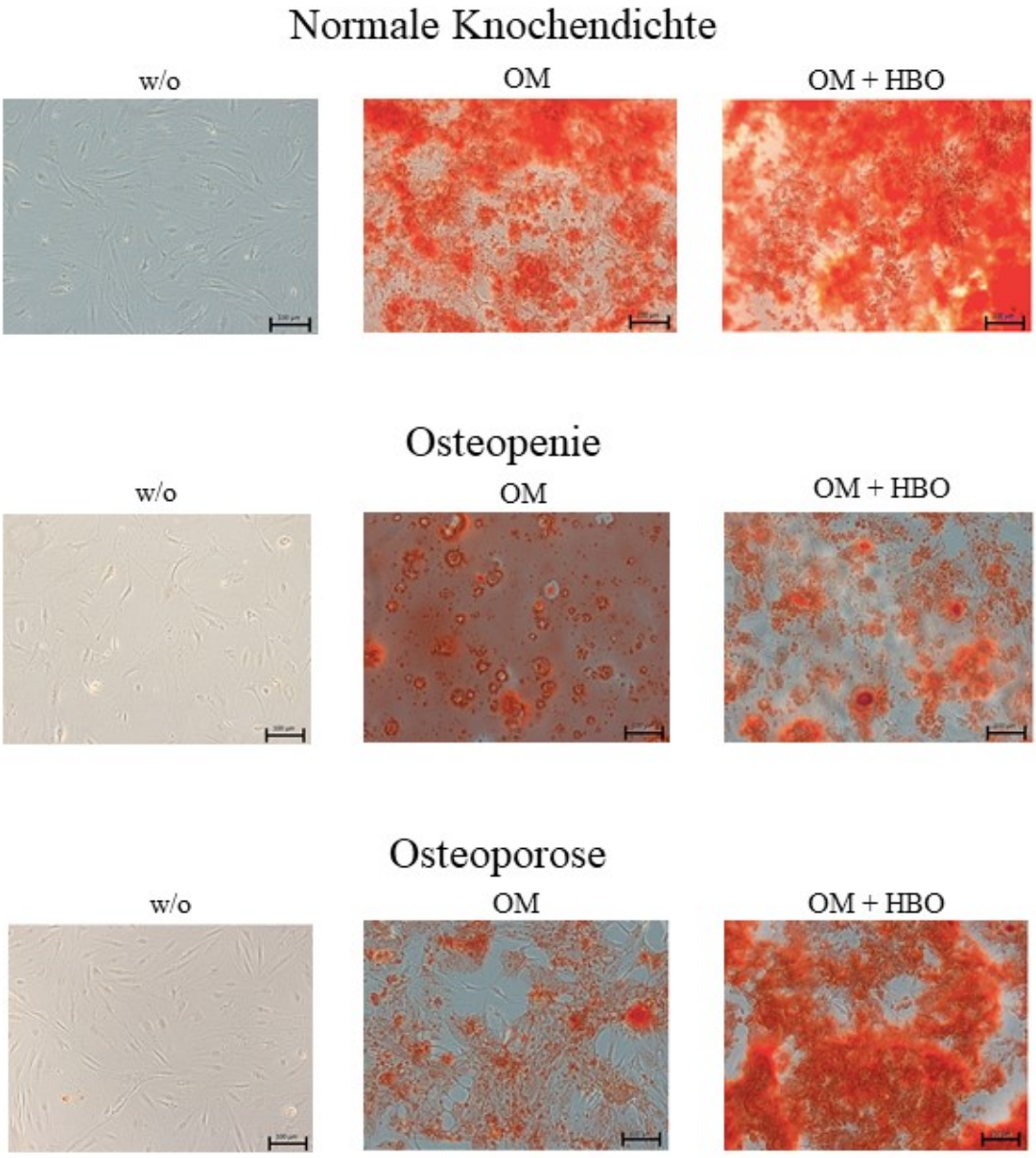



***Abbildung 12**: Alizarinrot-S Zeiss-Auflichtmikroskop;*
*links Tag 0, Mitte Tag 21 ohne HBO, rechts Tag 21 mit HBO*

In Abb. 13 ist der Einfluss der HBO-Behandlung unter additiver Behandlung mit Katalase visualisiert. In allen drei Versuchsgruppen zeigte sich nach 21 Tagen eine deutlich gesteigerte osteogene Differenzierung durch die Verwendung der Katalase im Vergleich zur Verwendung von reinem OM-Medium (Vergleich Abb. 12). Der Effekt der Katalase ließ sich auch hier durch die Behandlung mit der HBO steigern.

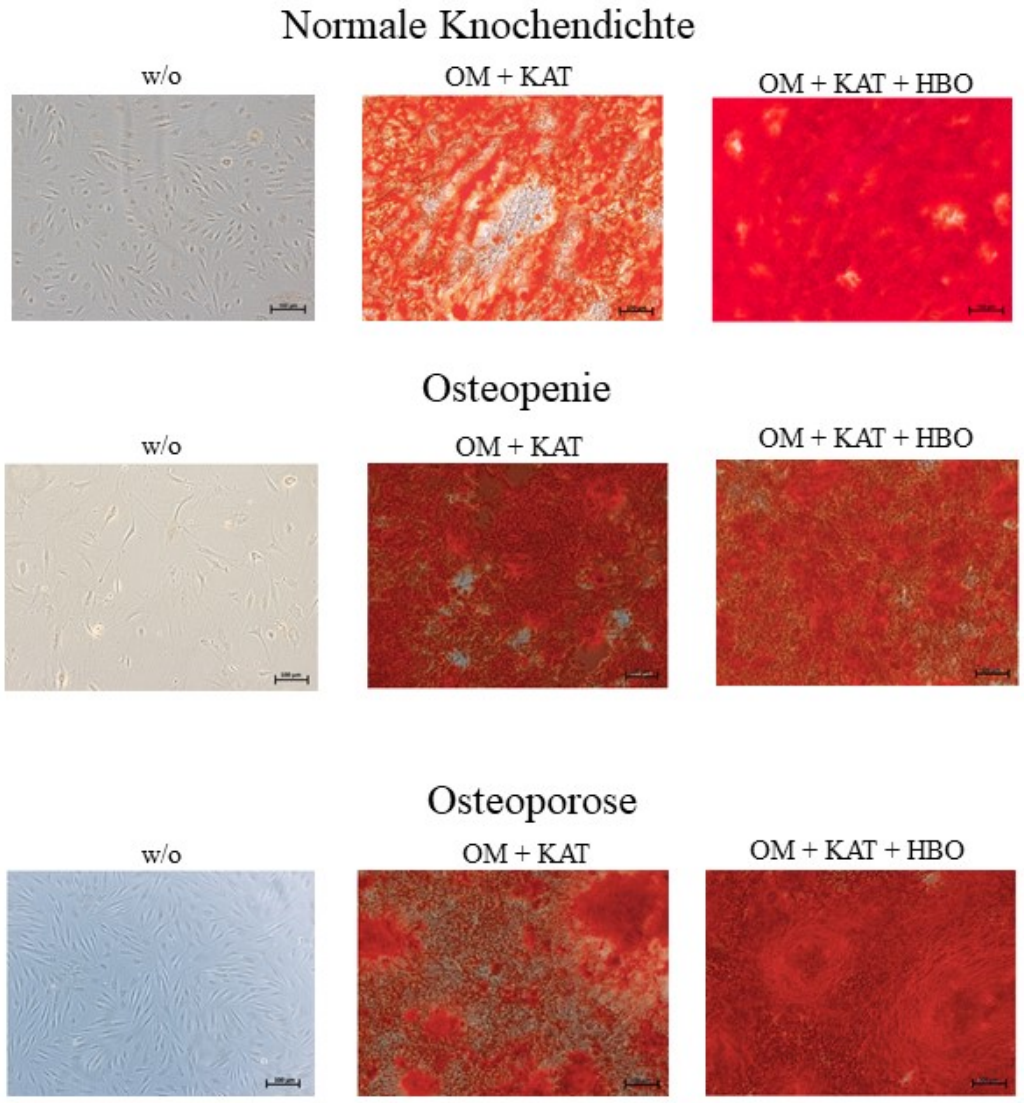



***Abbildung 13:*** *Alizarinrot-S Zeiss-Auflichtmikroskop,*
*links Tag 0, Mitte Tag 21 ohne HBO, rechts Tag 21 mit HBO*

### 4.1.1. Osteogene Differenzierung unter Standardbedingungen

In Abb. 14 sind die Ergebnisse für die osteogene Differenzierung durch Beeinflussung der vier verschiedenen Medienzusätze (OM, +KAT, +$H_2O_2$, +KAT + $H_2O_2$) ohne HBO-Behandlung dargestellt. Zudem wurde eine Unterteilung in die Gruppen normale Knochendichte, osteopenische und osteoporotische Osteoblasten unternommen. Die Osteoblasten wurden mit dem osteogenen Differenzierungsmedium und additiv mit Katalase (125 U/ml) und $H_2O_2$ (50 µM) behandelt.

Allein mit dem osteogenen Differenzierungsmedium kam es schon zur osteogenen Differenzierung gemessen an der Kalziumeinlagerung in die extrazelluläre Matrix.

Auch die Behandlung mit Katalase hat zu einer Steigerung der osteogenen Differenzierung geführt. Vor allem bei der Osteopenie und bei den gesunden Osteoblasten zeigte sich eine deutliche Steigerung der Differenzierung. Der Einbau des Kalziums in die EZM wurde unter der Behandlung mit $H_2O_2$ und ohne HBO nicht erreicht. $H_2O_2$ hatte hier einen hemmenden Effekt auf die Osteogenese.

Osteogene Differenzierung unter Standardbedingungen:

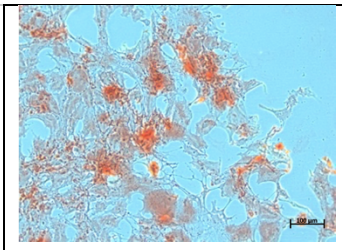
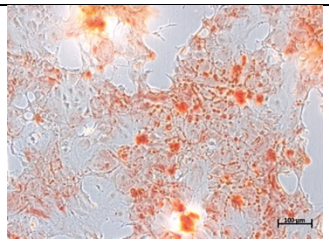
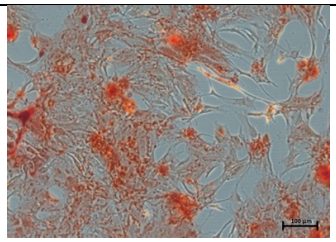
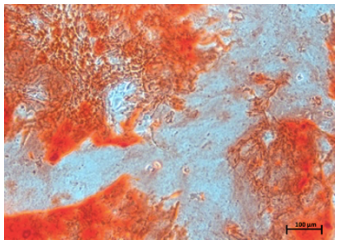
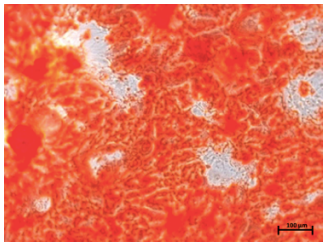
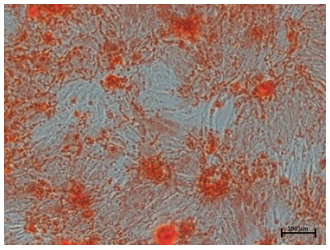
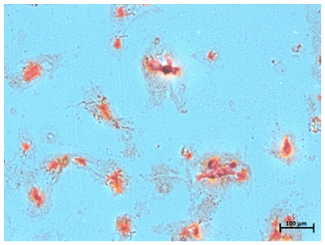
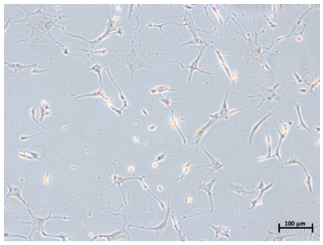
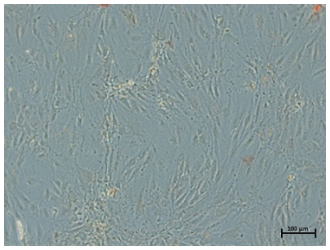
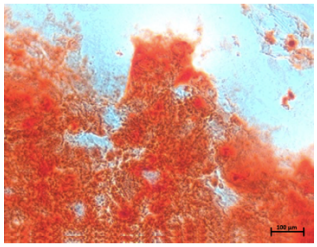
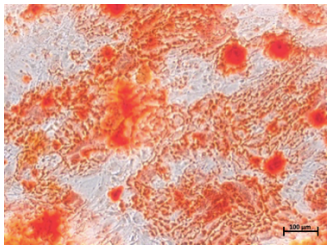
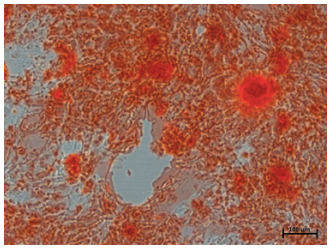
| ***Ohne HBO*** | **Normwertige Knochendichte** | **Osteopenie** | **Osteoporose** |
|---|---|---|---|
| *OM* |  |  |  |
| *OM +KAT* |  |  |  |
| *OM +$H_2O_2$* |  |  |  |
| *OM +KAT +$H_2O_2$* |  |  |  |

***Abbildung 14:*** *Alizarin-Rot-S ohne HBO Tag 21, Einteilung Normwertige Knochendichte / Osteopenie / Osteoporose und Medienzusätze*

### 4.1.2. Osteogene Differenzierung unter Einfluss der HBO

Die Behandlung mit der Hyperbaren Sauerstofftherapie führte zu einer vermehrten osteogenen Differenzierung als bei der Behandlung ohne die HBO (Abb. 15).

Allein in der Behandlung mit dem Differenzierungsmedium zeigte sich in allen drei Gruppen im Vergleich ohne die Behandlung eine deutliche Steigerung der osteogenen Differenzierung. Diese war vor allem bei der Osteopenie und Osteoporose sehr ausgeprägt.

Osteogene Differenzierung unter Einfluss der HBO:

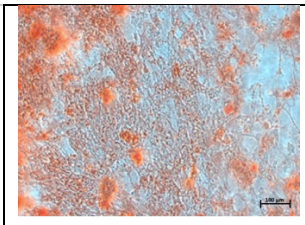
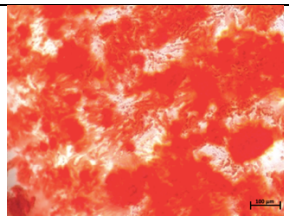
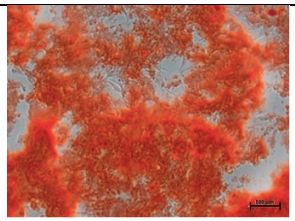
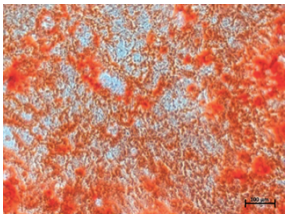
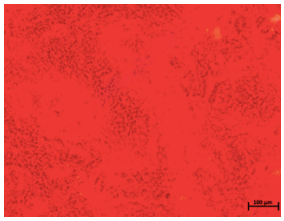
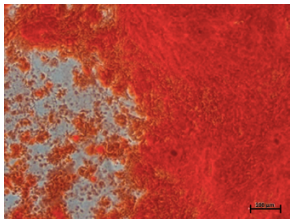
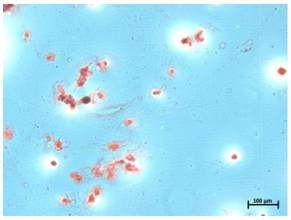
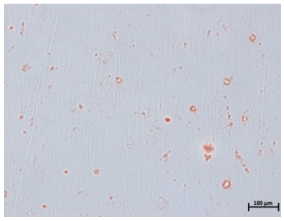
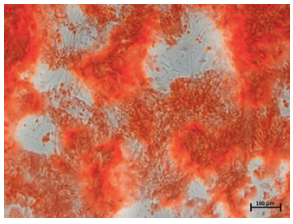
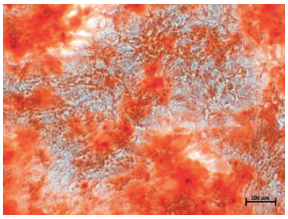
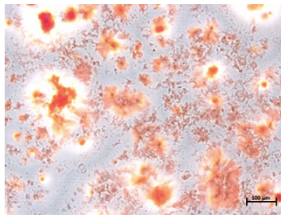
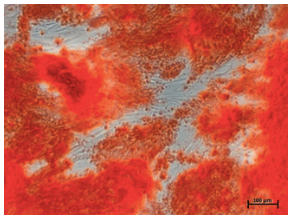
| ***Mit HBO*** | **Normwertige Knochendichte** | **Osteopenie** | **Osteoporose** |
|---|---|---|---|
| *OM* |  |  |  |
| *OM* *+KAT* |  |  |  |
| *OM* *+ $H_2O_2$* |  |  |  |
| *OM* *+KAT* *+ $H_2O_2$* |  |  |  |

***Abbildung 15:*** *Alizarin-Rot-S mit HBO Tag 21,*
*Einteilung Normwertige Knochendichte/Osteopenie/Osteoporose und Medienzusätze*

### 4.1.3. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung

Mit Hilfe der CPC-Rücklösung wurde die Fähigkeit der Osteoblasten, Kalzium in die Matrix einzulagern, quantifiziert (Gregory *et al.*, 2004).

Bei Osteoblasten, die von Patienten mit einer normalen Knochendichte stammen, führte die Behandlung mit der HBO insgesamt zu einer signifikant verbesserten osteogenen Differenzierung. Zudem wurde ein Kalziumanstieg in der EZM durch die additive Behandlung mit Katalase und $H_2O_2$ messbar gezeigt. Insgesamt konnte also durch die Behandlung mit HBO und Katalase eine signifikant höhere osteogene Differenzierung beobachtet werden. Durch die Behandlung mit der Katalase und dem $H_2O_2$ wurde hier eine Erhöhung der osteogenen Differenzierung in Form von Kalziumeinlagerungen von 81,1 % im Vergleich ohne die HBO bestimmt. Auch die alleinige Behandlung mit der HBO (abgesehen von den Zusätzen) hat eine signifikante Erhöhung der Kalziumeinlagerung in die EZM bis auf das Dreifache im Vergleich zur Kalziumeinlagerung ohne die HBO ergeben (Abb. 16).

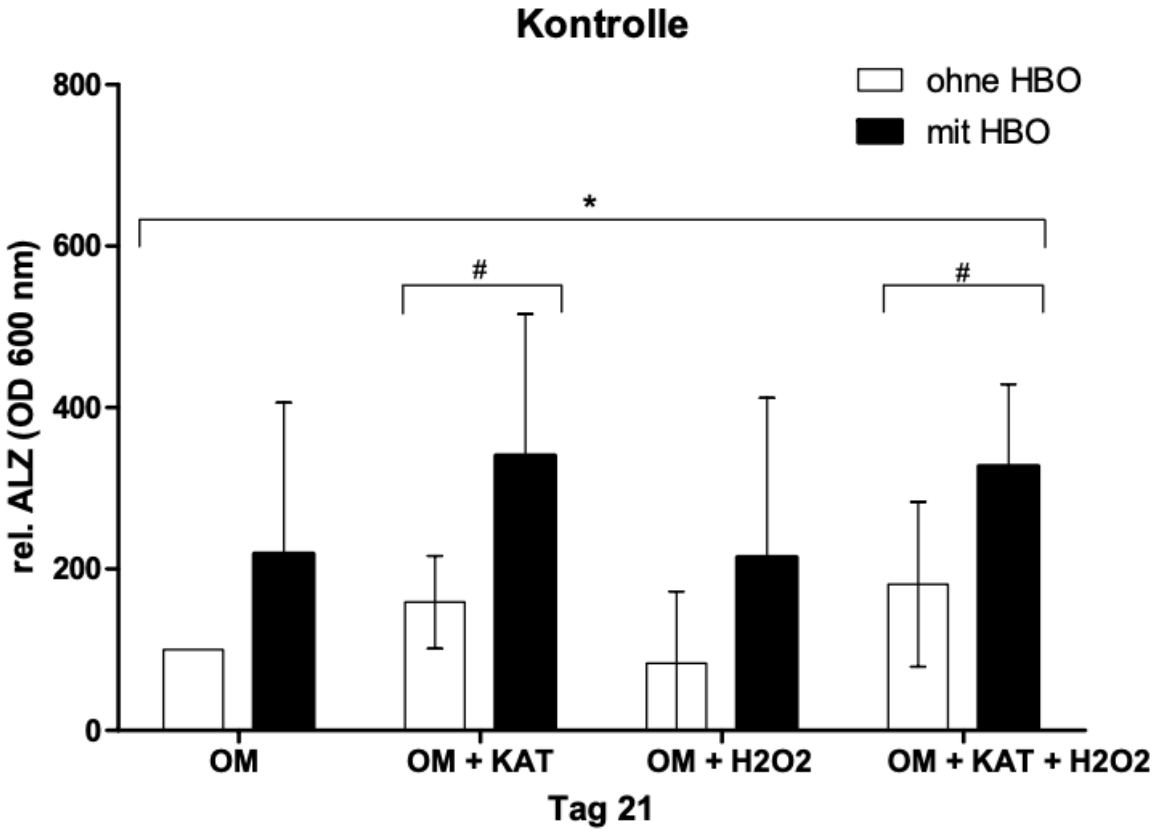



***Abbildung 16:*** *Alizarin-Rot-S Rücklösung Kontrolle*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium, OD = optische Dichte)*

### 4.1.4. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten

In der Osteopenie-Gruppe (Abb. 17) wurde ebenfalls signifikant mehr Kalzium in die EZM durch die Behandlung mit der HBO eingebaut. Insgesamt konnte bei der Osteopenie-Gruppe eine Signifikanz (p-Wert ≤ 0,05) zwischen der HBO und dem Ausbleiben der HBO erkannt werden. Hier kam es zu einem Anstieg der osteogenen Differenzierung durch die HBO-Behandlung von bis zu 41 %. Es zeigte sich jedoch, dass es durch die Verwendung von Katalase zu einer tendenziellen Verbesserung der osteogenen Differenzierung kam.

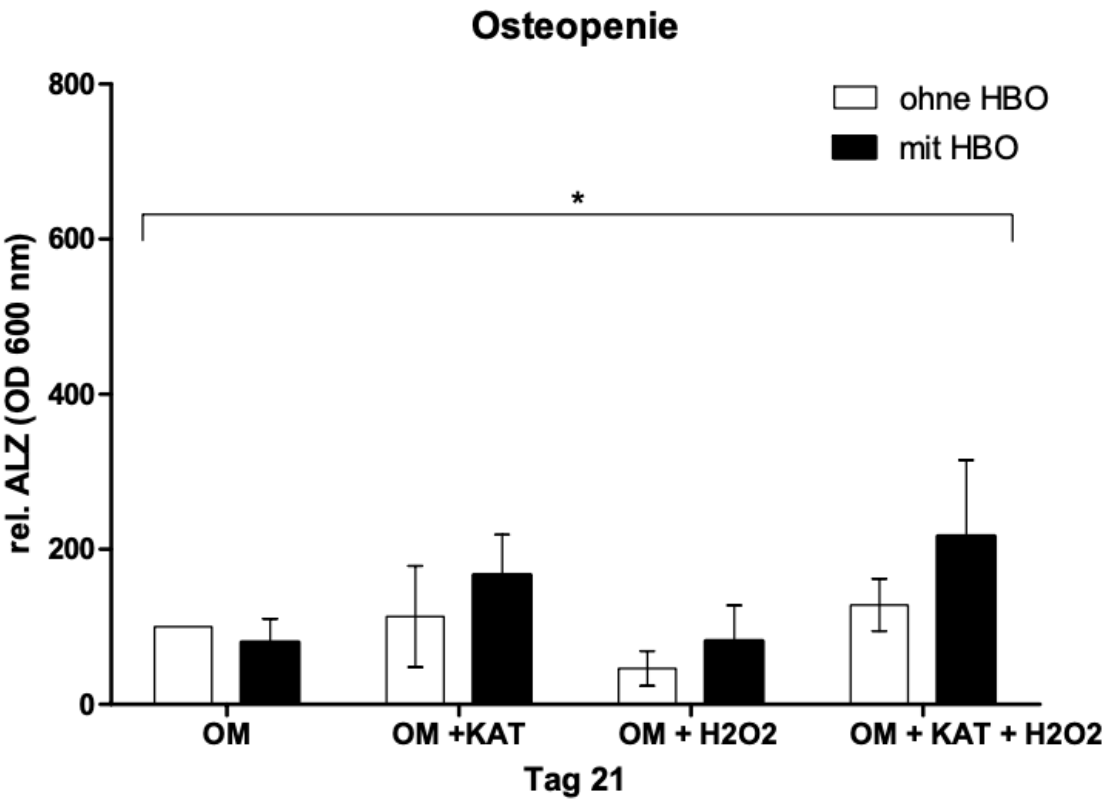



***Abbildung 17:*** *Alizarin-Rot-S Rücklösung Osteopenie*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium, OD = optische Dichte)*

### 4.1.5. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten

In der Osteoporose-Gruppe (Abb. 18) konnte kein fördernder Effekt durch die HBO- oder die Katalasebehandlung detektiert werden.

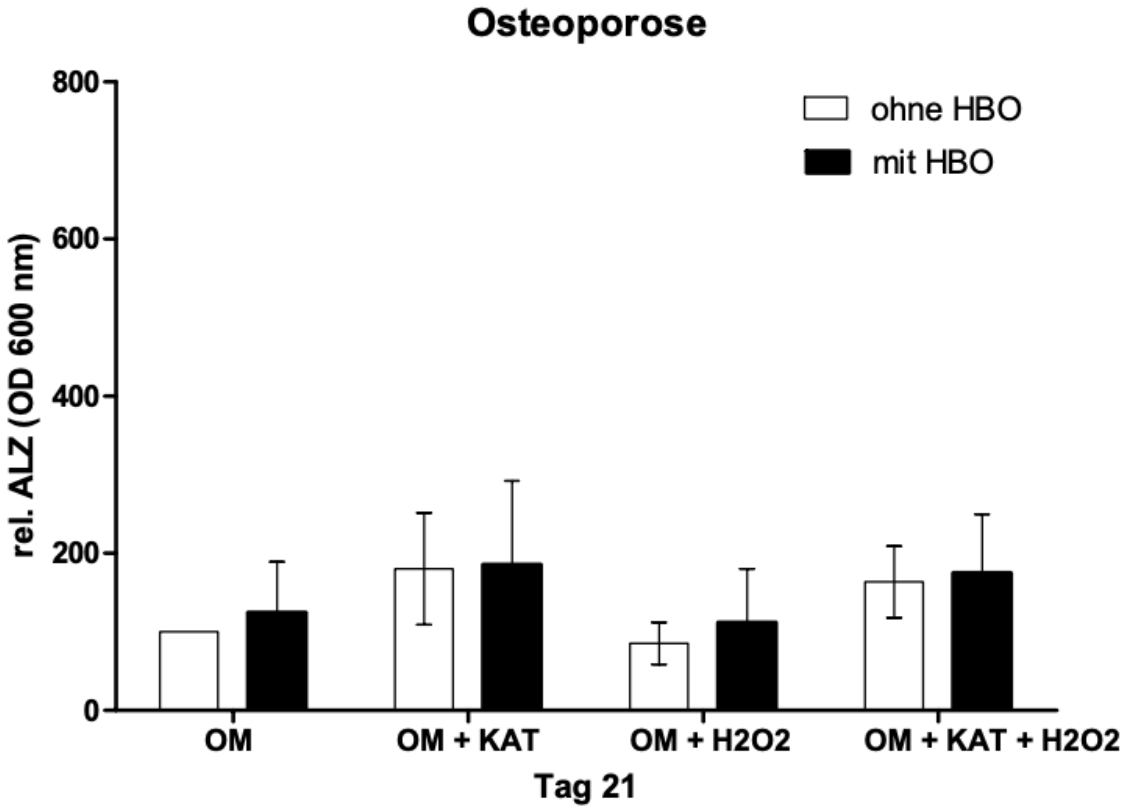



***Abbildung 18:*** *Alizarin-Rot-S Rücklösung Osteoporose*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium, OD = optische Dichte)*

Durch die HBO konnte bei den Osteoblasten mit gesunder Knochendichte und den Osteopenie-Osteoblasten eine signifikante Steigerung der osteogenen Differenzierung erreicht werden. Zudem gab es bei den gesunden Osteoblasten zusätzlich eine weitere signifikante Steigerung durch die additive Behandlung der Katalase.

## 4.2. Quantifizierung der osteogenen Differenzierung durch das Alkalische Phosphatase-Assay

Ein weiterer Parameter, um die osteogene Differenzierung zu analysieren, ist die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

### 4.2.1. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase in Osteoblasten von Patienten mit normwertiger Knochendichte

In der Gruppe von Patienten, deren Osteoblasten mit einer normalen Knochendichte, konnte eine signifikant höhere Maß an Alkalische-Phosphatase-Aktivität (AP) mit ergänzender HBO-Behandlung nachgewiesen werden. Zusammengefasst steigerte die HBO die AP-Aktivität bei gesunden Osteoblasten um das Doppelte bis nahezu das Dreifache (Abb. 19) im Vergleich zu fehlender HBO-Therapie.

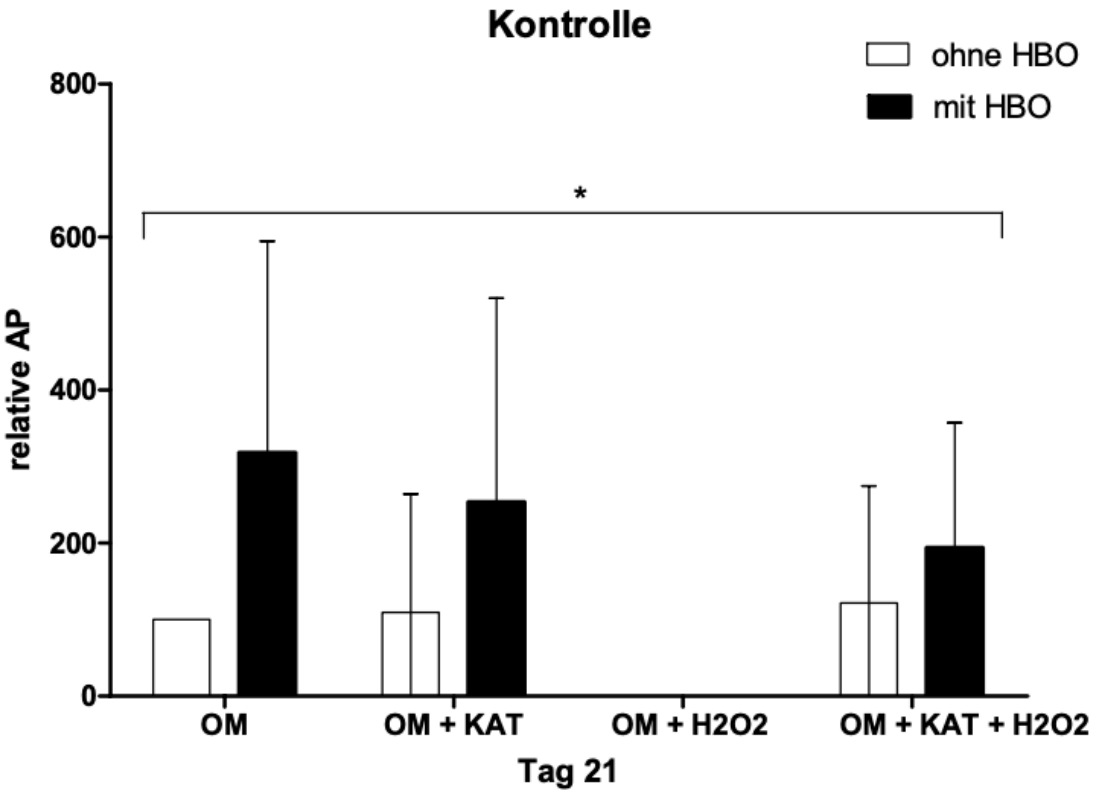



***Abbildung 19**: Relative Alkalische Phosphatase Kontrolle*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

### 4.2.2. Bestimmung der Alkalischen Phophatase in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten

In der Osteopenie-Gruppe kam es zu einer signifikanten Steigerung der AP durch die HBO im Vergleich zur Behandlung ohne die HBO. Die additive Behandlung der Osteoblasten mit OM und zusätzlich Katalase und $H_2O_2$ steigerte signifikant die Aktivität um 69,3 %. Auch eine Steigerung der AP mit Katalase allein konnte erreicht werden, diese war allerdings nicht signifikant. Die Aktivität der AP war bei der HBO im Vergleich zur Nichtbehandlung der Osteoblasten signifikant um fast das Dreifache gesteigert (Abb. 210.

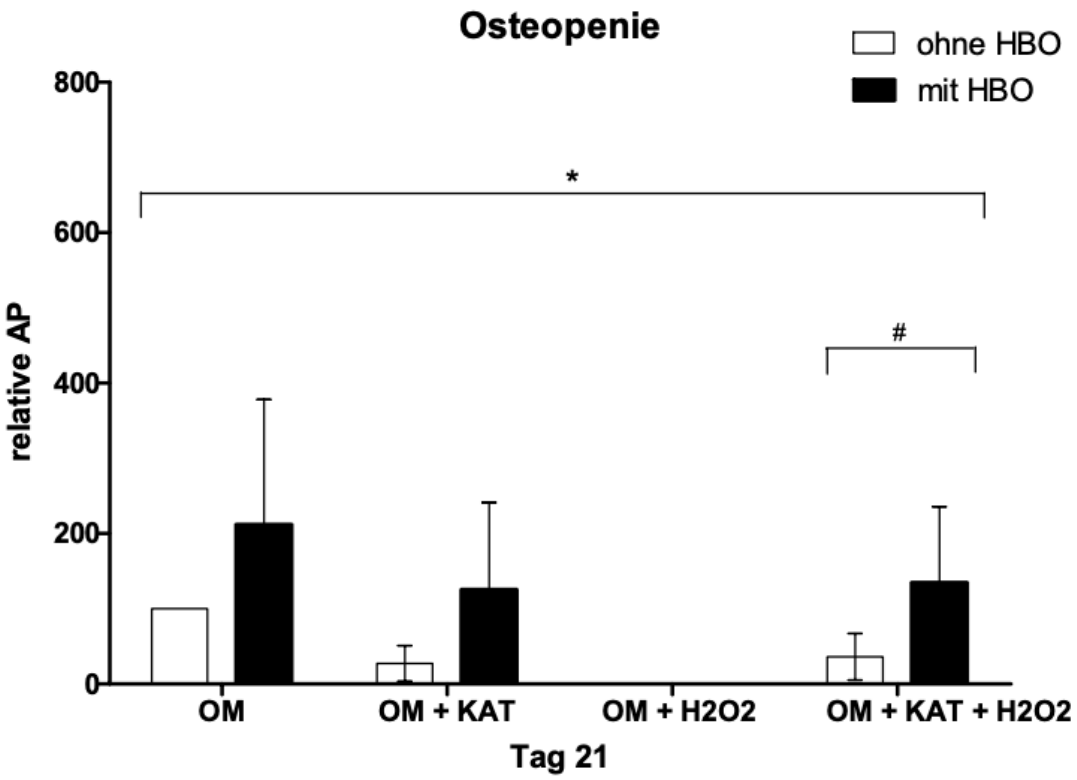



***Abbildung 20:*** *Relative Alkalische Phosphatase Osteopenie*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

### 4.2.3. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten

Insgesamt steigerte die HBO-Behandlung signifikant die Aktivität der AP in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten um 62 % (Abb. 21).

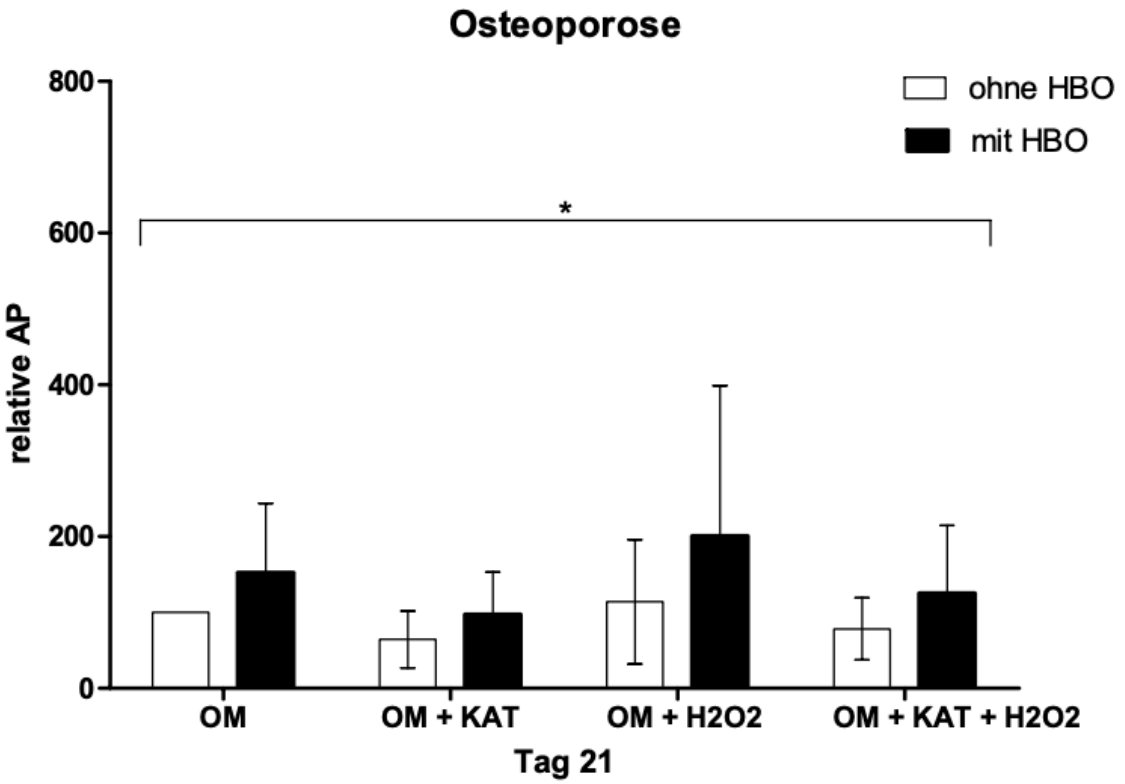



***Abbildung 21:*** *Relative Alkalische Phosphatase Osteoporose*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

In allen Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der AP durch die Behandlung mit der HBO.

## 4.3. Die Untersuchung von Osteoporose-relevanten Parametern

OPG ist ein Glycoprotein aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie 11b. OPG wird nicht nur in Osteoblasten, sondern auch in anderen Geweben exprimiert. Es verhindert die Aktivierung der Osteoklasten, indem es RANKL abfängt.

### 4.3.1. OPG-Expression in Osteoblasten

Insgesamt wurde die OPG-Expression durch die HBO um ca. 27 % signifikant erniedrigt (Abb. 22). In Osteoblasten mit einer normwertigen Knochendichte wurde die OPG-Expression nach 14 Tagen durch die HBO-Behandlung insgesamt signifikant erniedrigt. Die Behandlung mit der HBO und OM führte zu einer signifikant um 28 % niedrigeren OPG-Expression Behandlung ohne die HBO. Ebenfalls zeigte die HBO-Behandlung zusammen mit der additiven Behandlung von Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) eine um 67 % signifikant erniedrigte OPG-Expression.

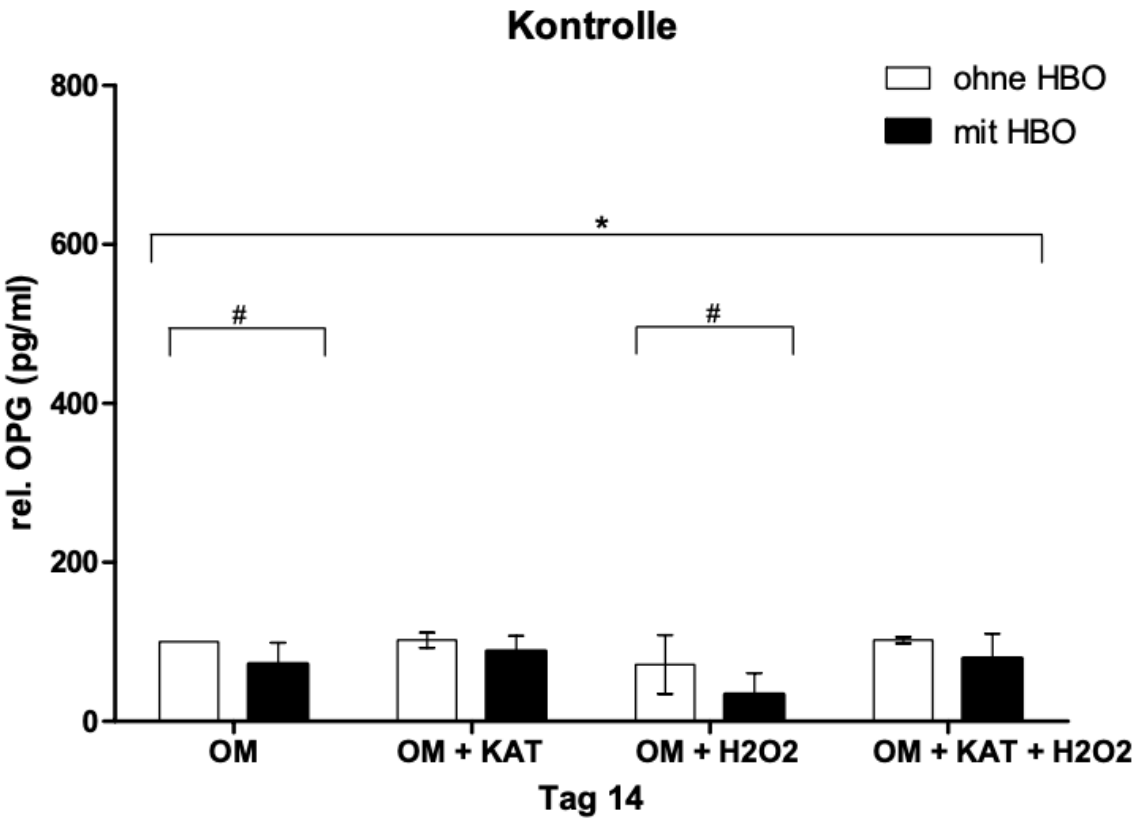



*Abbildung 22: OPG Kontrolle Tag 14*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

Nach 21 Tagen konnte weder durch eine HBO-Behandlung noch durch die Zugabe von Katalase die OPG-Expression signifikant moduliert werden (Abb. 23).

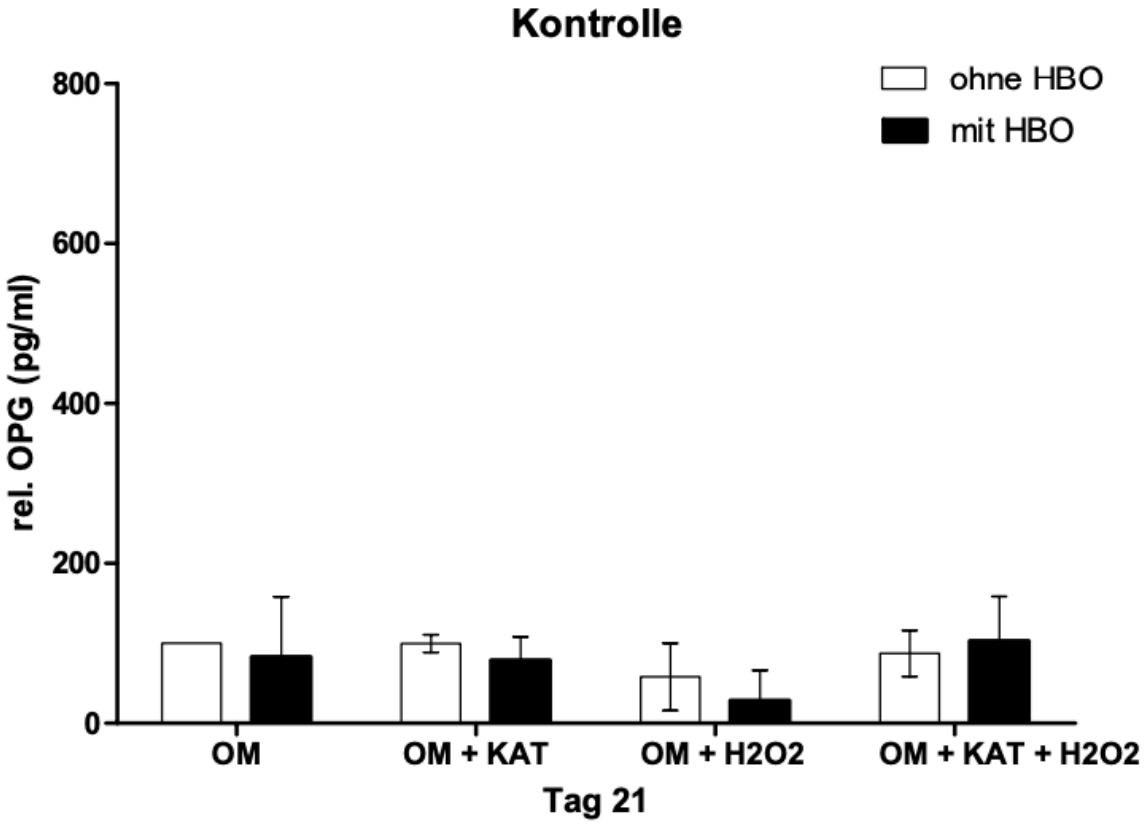



***Abbildung 23:*** *OPG Kontrolle Tag 14*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

### 4.3.2. OPG-Expression in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten

Bei den Osteoblasten von Patienten mit einer Osteopenie konnte eine signifikante Abnahme der OPG -Konzentration um 72 % durch die HBO-Behandlung nach 14 Tagen demonstriert werden (Abb. 24).

Ebenso zeigte sich das OPG bei den Osteopenie-Osteoblasten nach 14 Tagen mit 64 % Verringerung mit der HBO signifikant erniedrigt. Bei der additiven Behandlung mit der Katalase und der HBO zeigte sich eine Verringerung der OPG-Konzentration um 66 %. Die additive Behandlung mit der HBO führte zu einer tendenziellen Reduktion der OPG-Expression. Zusammenfassend ergibt sich bei der Osteopenie-Gruppe eine verminderte OPG-Expression mit HBO nach Tag 14 (Abb. 24). Nach 21 Tagen konnte kein signifikanter Einfluss der HBO auf die OPG-Expression beobachtet werden (Abb. 25).

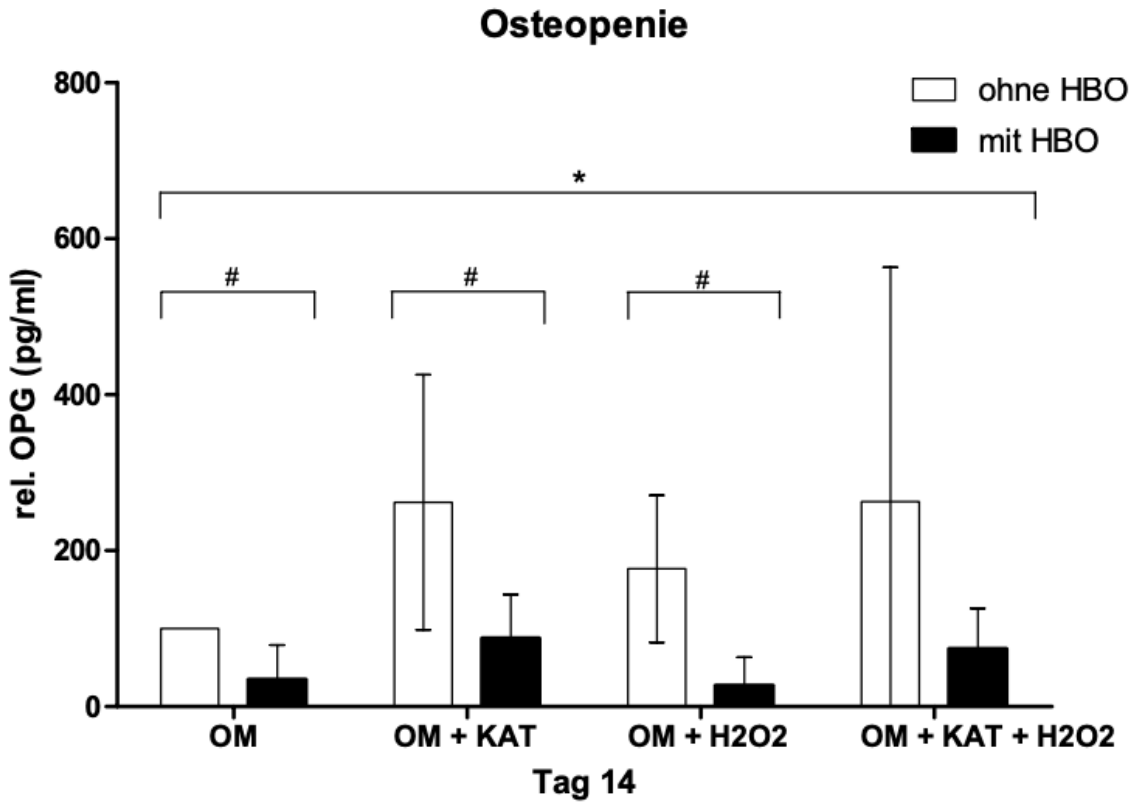



***Abbildung 24:*** *OPG Osteopenie Tag 14*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

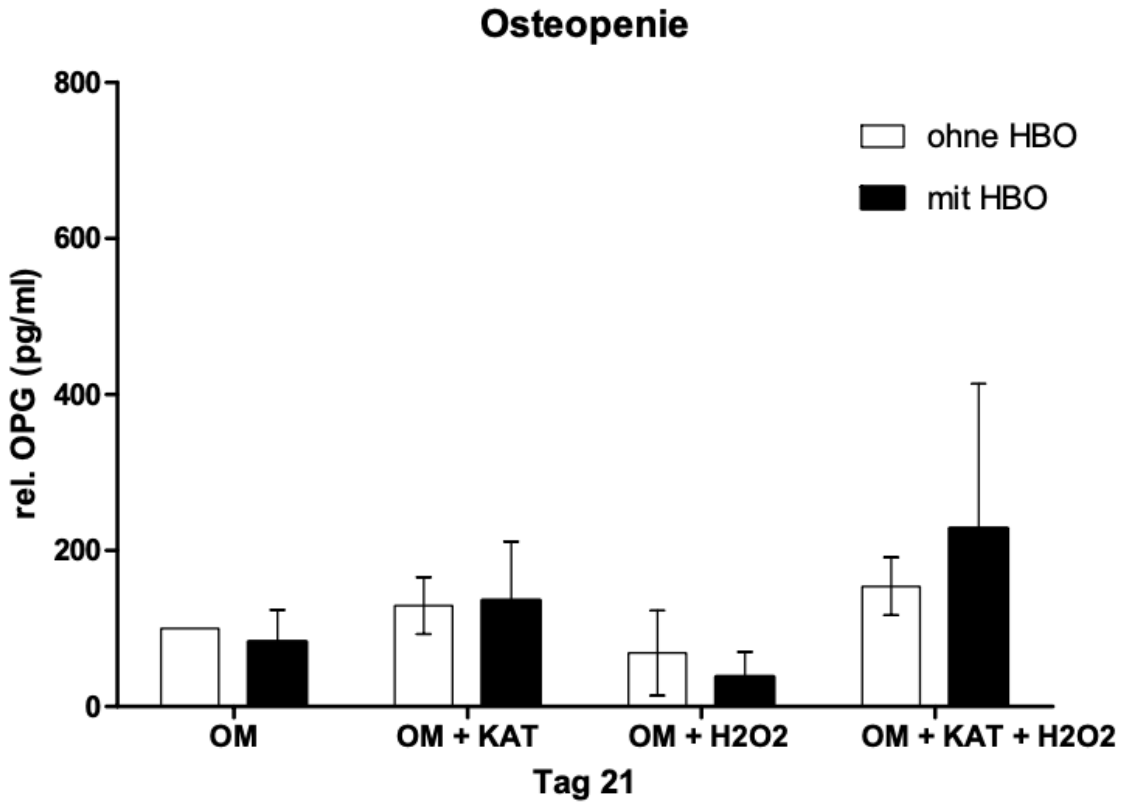



***Abbildung 25:*** *OPG Osteopenie Tag 21*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

### 4.3.3. OPG-Expression in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten

Die HBO führte zur Reduktion der OPG-Expression der Osteoblasten von Osteoporose-Patienten um 56 % und ist somit signifikant. Bei der HBO in Verbindung mit Katalase zeigte sich bei den Osteoblasten ebenfalls eine signifikant erniedrigte OPG-Expression. Auch hier konnten die Osteoblasten (OM + KAT) um über das Doppelte signifikant mehr OPG produzieren im Vergleich zur HBO (Abb. 26).

Auch nach 21 Tagen zeigten sich signifikante Unterschiede in der OPG-Konzentration zugunsten der Nichtbehandlung mit einer Erhöhung von 41 %. Bei der unterschiedlichen Medienbehandlung waren eine signifikant höhere Expression bei der Behandlung mit OM-Medium und mit Katalase ohne die HBO erkennbar (Abb. 27).

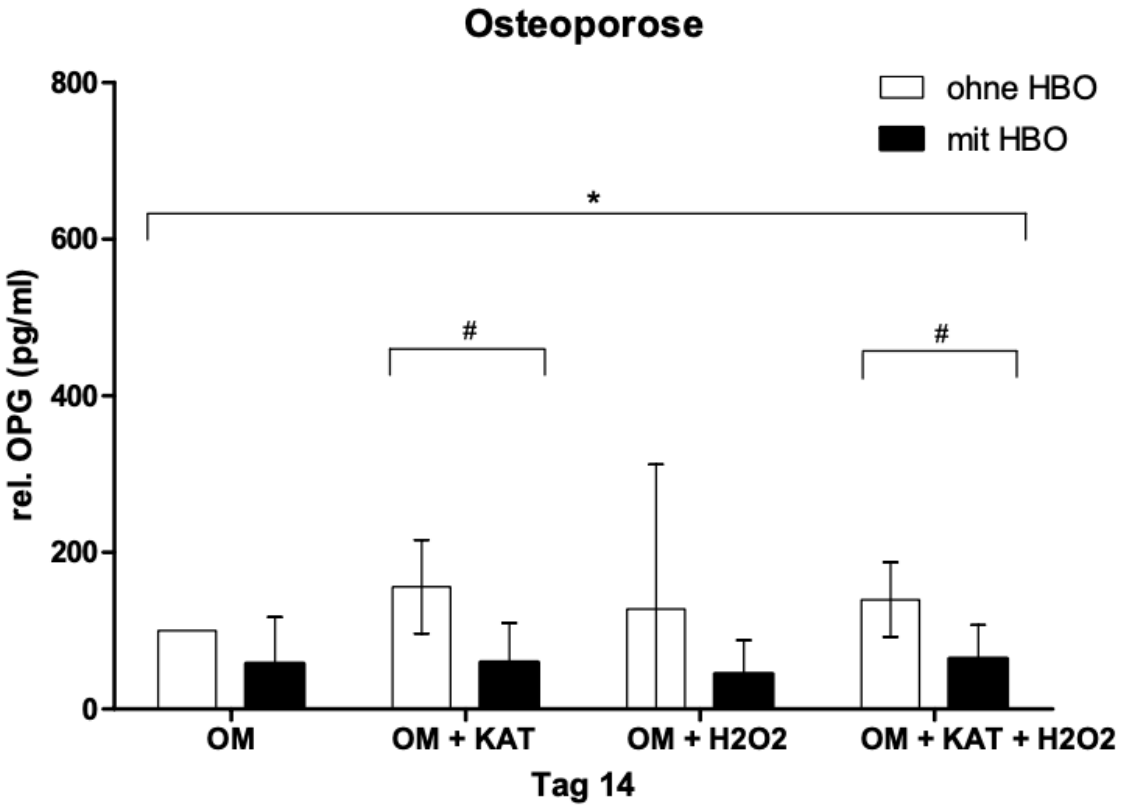



***Abbildung 26**: OPG Osteoporose Tag 14*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

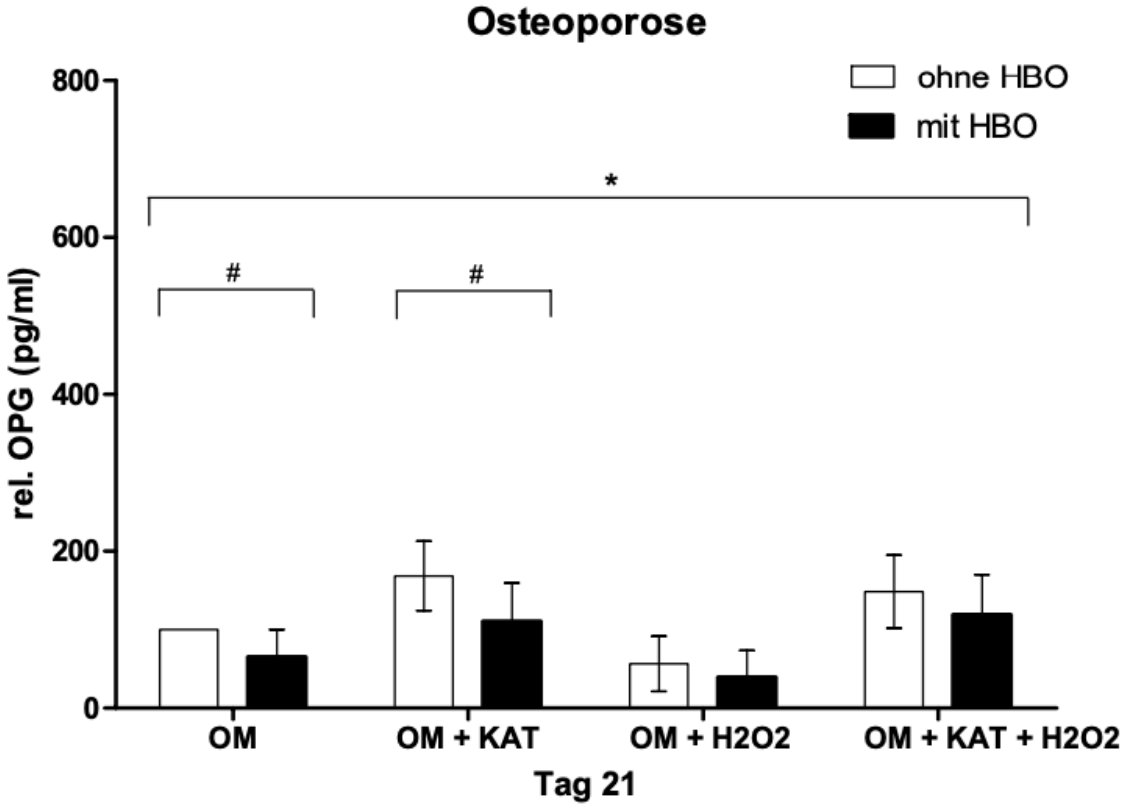



***Abbildung 27:*** *OPG Osteoporose Tag 21*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

Zusammengefasst ergab sich, dass die HBO die OPG-Expression in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten insgesamt signifikant erniedrigte. Die additive Behandlung mit Katalase führte zu einer Erhöhung der OPG-Expression im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle ohne HBO (Abb. 27). Sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen hat sich keine relevante OPG-Erhöhung bei den Osteoblasten der Osteoporose-Patienten mit HBO zeigen können.

## 4.4. Vergleichende Analyse der RANKL-Expression

Der Receptor activator of NF-κB-Ligand, kurz RANKL, gilt als Ligand für den Transmembranrezeptor RANK. RANKL reguliert die Osteoklasten, indem es an RANK auf der Oberfläche der Osteoklasten bindet und diese aktiviert. Eine vermehrte RANKL-Expression führt zu einer vermehrten Aktivierung der Osteoklasten, was zu vermehrtem Knochenabbau führt (Boyce and Xing, 2007).

### 4.4.1. Evaluation der RANKL-Expression in Osteoblasten

Eine verminderte Regulation von RANKL in den Osteoblasten von Patienten mit normwertiger Knochendichte konnte durch die HBO nicht erreicht werden (Abb. 28).
Auch nach 21 Tagen konnte die RANKL-Expression nicht durch HBO-Behandlung inhibiert werden (Abb. 29).

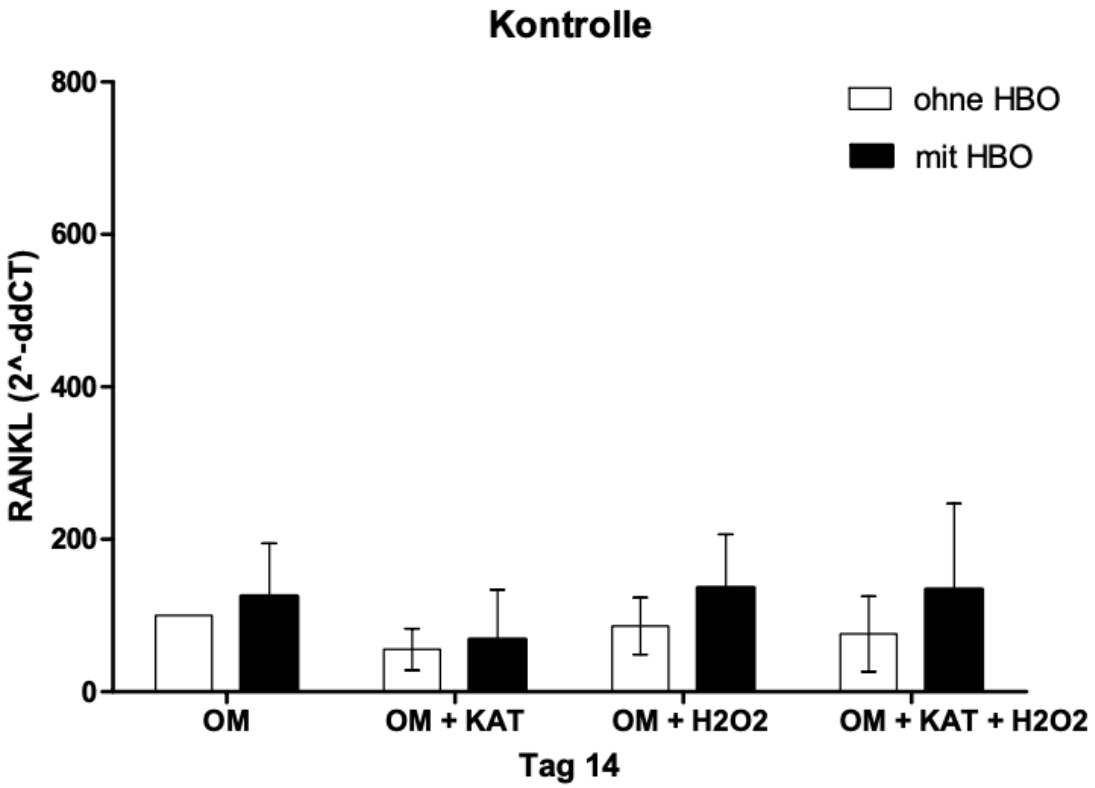



***Abbildung 28:*** *RANKL Tag 14 Kontrolle*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

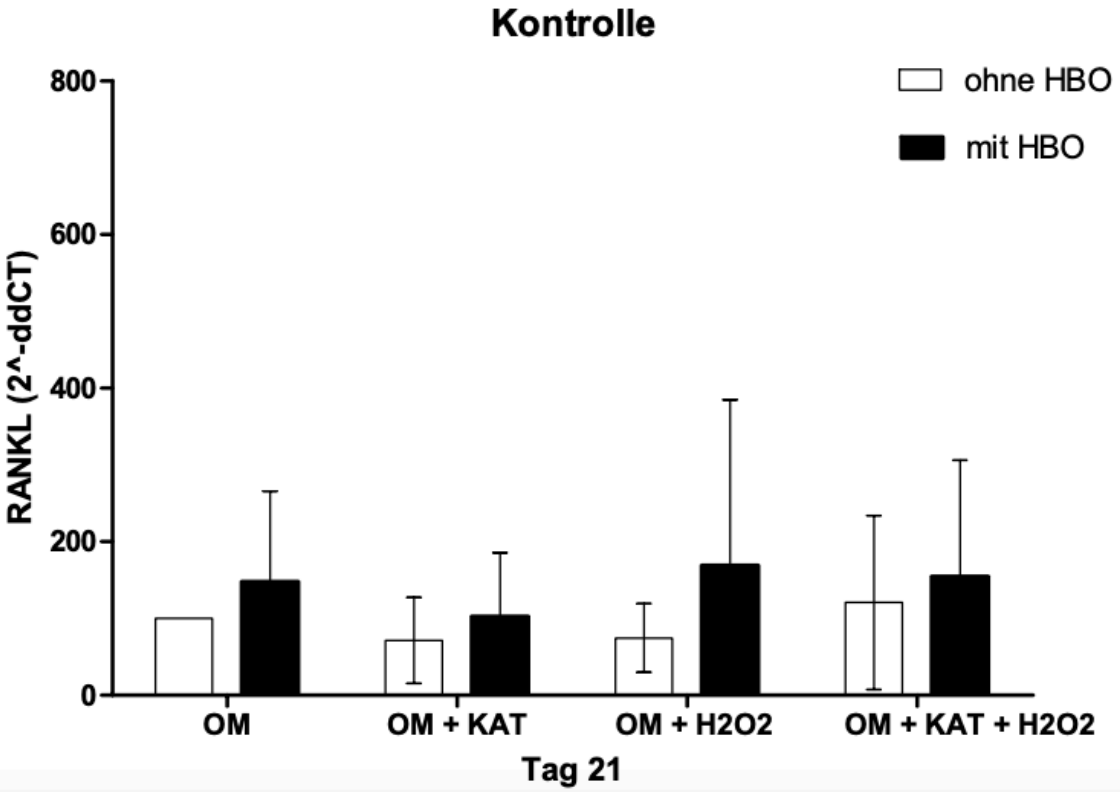



***Abbildung 29:*** *RANKL Tag 21 Kontrolle*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

### 4.4.2. RANKL-Expression in Osteoblasten von Osteopenie-Patienten

Sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 konnte bei den Osteopenie-Osteoblasten keine signifikante Modulation des RANKL durch die HBO demonstriert werden (Abb. 30 und Abb. 31).

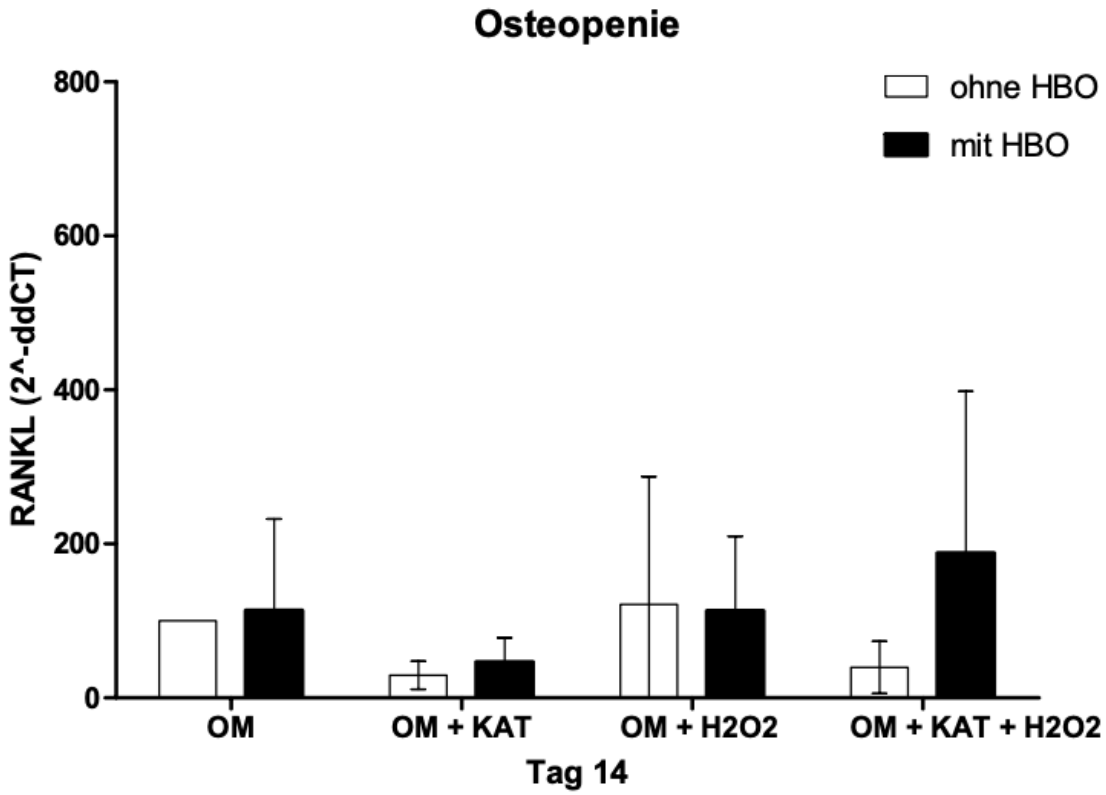



***Abbildung 30:*** *RANKL Tag 14 Osteopenie*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

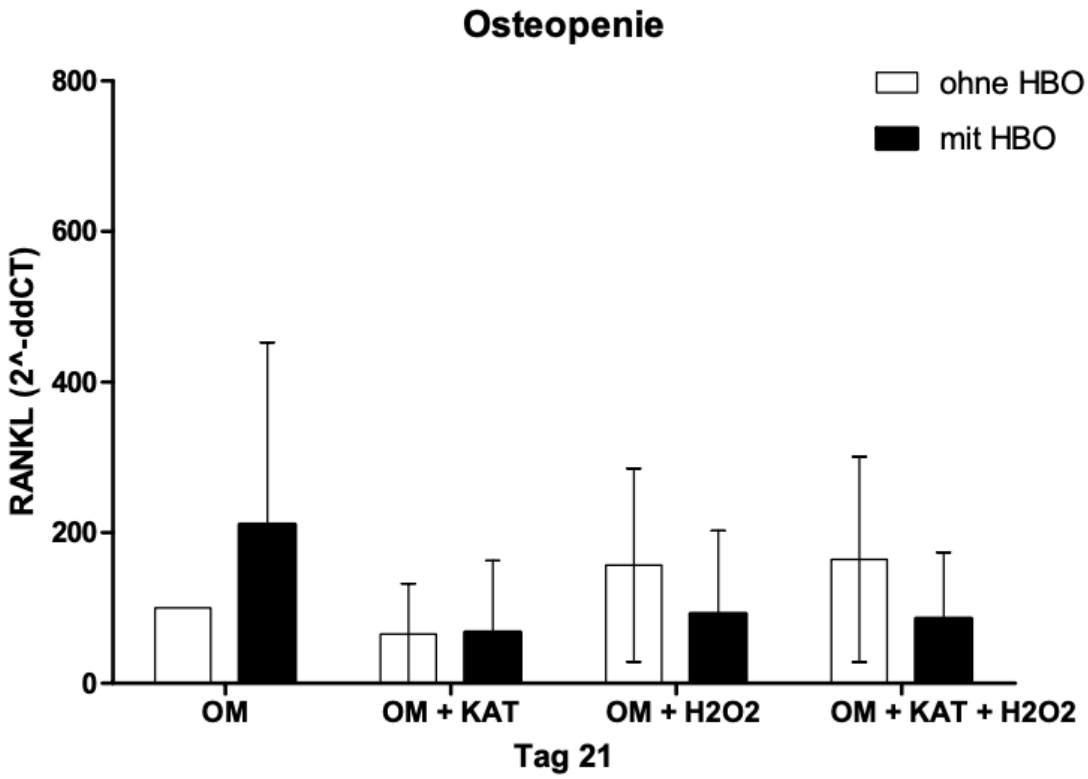



***Abbildung 31:*** *RANKL Tag 21 Osteopenie*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

### 4.4.3. RANKL-Expression in Osteoblasten von Osteoporose-Patienten

Bei der Behandlung der osteoporotischen Osteoblasten fiel auf, dass es zu einer Erhöhung des RANKL bei der 14-tägigen Behandlung ohne HBO im Vergleich zur additiven Behandlung mit der HBO kam. Durch die additive Behandlung mit Katalase kam es zudem zu einer tendenziellen Senkung der RANKL-Konzentration im Vergleich zu den anderen Mediengruppen (Abb. 32).

Die Osteoporose-Osteoblasten mit HBO exprimierten an Tag 21 im Vergleich zu denen an Tag 14 deutlich mehr RANKL. Vor allem die Behandlung mit der HBO zeigte hier eine tendenzielle Erhöhung des RANKL im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne HBO-Behandlung (Abb. 33).

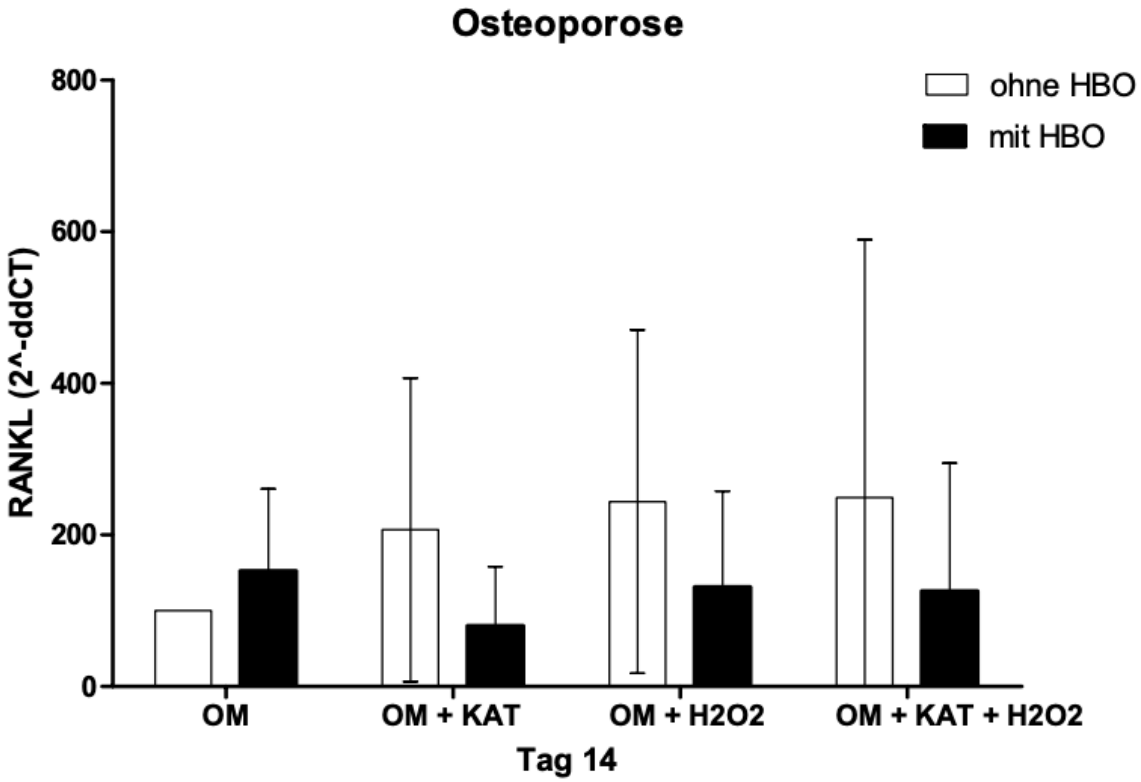



***Abbildung 32:*** *RANKL Tag 14 Osteoporose*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

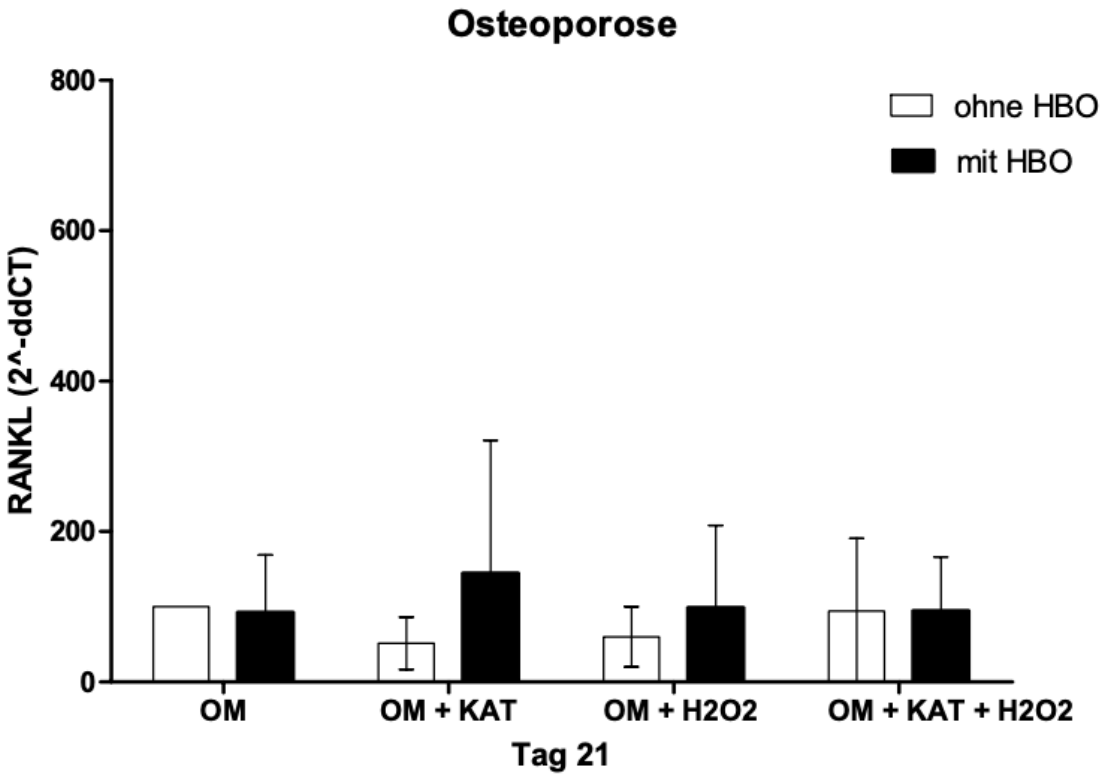



***Abbildung 33:*** *RANKL Tag 21 Osteoporose*
*(* = Signifikanz HBO, # = Signifikanz Behandlung OM-Medium)*

Insgesamt konnte die RANKL-Expression durch die HBO eher nicht moduliert werden. Lediglich bei den Osteoporose-Osteoblasten konnte eine tendenziell verringerte Expression von RANKL durch die HBO-Behandlung nach 14 Tagen nachgewiesen werden. Eine additive Behandlung mit Katalase hat in allen drei Gruppen zur tendenziellen Verminderung der RANKL-Expression beigetragen.

# 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) auf die Osteogenese und auf Osteoporose-relevante Parameter in Osteoblasten älterer Patienten analysiert. Insbesondere sollten hierfür drei Patientengruppen verglichen werden: Osteoblasten von Patienten mit normwertiger Knochendichte, Osteopenie- und Osteoporose-Osteoblasten. Zur Untersuchung der Osteogenese wurde zum einen das Potenzial untersucht, Kalzium in die extrazelluläre Matrix (EZM) einzulagern. Zum anderen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) analysiert. Als Osteoporose-relevante Parameter sollten der Einfluss der HBO auf den *Receptor Activator of NF-κB*-Ligand (RANKL) und das Osteoprotegerin (OPG) evaluiert werden. Zusätzlich wurde das Antioxidans Katalase und ihr Einfluss auf die osteogene Differenzierung der Osteoblasten untersucht.

Zur Behandlung von Osteoporose gelten momentan laut S3-Leitlinie als Goldstandard eine tägliche Zufuhr von 1000 mg Kalzium und zusätzlich 800 - 1000 I. E. Vitamin D. Postmenopausale Frauen mit einem erhöhten Risiko einer peripheren oder vertebralen Fraktur werden zusätzlich mit z. B. Alendronat oder Bazedoxifen, Männer mit erhöhtem Frakturrisiko mit z. B. Alendronat oder Denosumab behandelt (S3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose, 2017). Die medikamentöse Therapie mit Bisphosphonaten geht für die Patienten mit einer Reihe von Nebenwirkungen einher, wie z. B. gastrointestinalen Beschwerden, Nierenversagen oder unspezifischer Konjunktivitis (Papapetrou, 2009). Aufgrund dieser Nebenwirkungen wird heutzutage intensiv nach alternativen Therapiemöglichkeiten gesucht, wie auch in der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend konnte in den Experimenten durch die HBO in allen drei Patientengruppen eine erhöhte osteogene Differenzierung demonstriert werden, vor allem bei Osteoblasten mit normwertiger Knochendichte und in der Osteopenie-Gruppe. Die additive Behandlung mit der Katalase erhöhte weiter signifikant die Osteogenese der Osteoblasten.

## 5.1. Auswirkungen der Hyperbaren Sauerstofftherapie auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten

Die Ergebnisse spiegeln wider, dass die Osteogenese der Osteoblasten durch die HBO vor allem in den Patientengruppen mit Osteoblasten normwertiger Knochendichte und bei Osteopenie-Osteoblasten signifikant verbessert werden konnte (Abb. 16, 17, 19, 20). Die HBO sollte auch hinsichtlich des Einflusses auf Osteoporose-relevante Parameter untersucht werden.
Die signifikant erhöhte Kalziumeinlagerung in die EZM wie o. g. kann von Studien durch Tuncay *et al* und Warren *et al.* untermauert werden. Die AP-Aktivität und die Produktion von *Transforming growth factor ß* (TGF-ß) wird durch die HBO direkt an der Frakturstelle beeinflusst, sowohl durch den erhöhten Umgebungsdruck von 3,3 bar ü. N. (≈ 2,4 ata) als auch durch die mit 100 % reinem $O_2$ angereicherte Umgebungsluft (Tuncay *et al.*, 1994, Warren *et al.*, 2001).

Es ist bekannt, dass eine lokalisierte Hypoxie, wie z. B an einer Frakturstelle, ein limitierender Faktor für die Frakturheilung sein kann (Grundnes and Reikerås, 1992, Gordillo and Sen, 2003). Die Heilung von Knochenbrüchen zeigt sich nach Wu *et al.* als vielschichtiger Prozess. Hier konnte herausgefunden werden, dass durch die HBO eine signifikant erhöhte Kalziumeinlagerung in die EZM erfolgte, sowie die AP-Aktivität der Osteoblasten gesteigert wurde (Wu *et al.*, 2007a). In der vorliegenden Arbeit konnte genau dies über einen Zeitraum von 21 Tagen durch signifikante Ergebnisse in Hinblick auf die Kalziumeinlagerung in die EZM und die AP-Aktivitätssteigerung in den Osteoblasten belegt werden. Es kam bei normwertiger Knochendichte zur Erhöhung der Kalziumeinlagerung um 81 % im Vergleich zur Behandlung ohne die HBO (Abb. 16). Bei den Osteopenie-Osteoblasten kam es zu einem signifikanten Anstieg der osteogenen Differenzierung durch die HBO-Behandlung von bis zu 41 % (Abb. 17).
Eine weitere Studie nach Lin *et al.* konnte eine erhöhte Kalziumeinlagerung in die EZM von Osteoblasten durch die HBO-Therapie nach sowohl 14 als auch 21 Tagen zeigen. Dies stützt die Aussage der vorliegenden Arbeit und der Studie nach Wu *et al.* zusätzlich (Lin *et al.*, 2014).
Eine Studie nach Grebeldinger *et al.* zeigte nach HBO-Behandlung bei diabetischem Fußsyndrom eine dystrophe Verkalkung in den Weichteilen des Unterschenkels und des Fußes und Symptome eines Raynaud-Syndroms. Dies wurde als Reaktion des Kalziums auf den erhöhten Sauerstoffpartialdruck bei der HBO-Therapie gewertet, es kam zu einer Störung der Kalziumhomöostase und somit zu einer Ablagerung von Kalzium im Weichteilgewebe. Da es sich in der Studie von Grebeldinger *et al.* allerdings um eine Einzelfallstudie handelt, ist zu

bedenken, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die zugrunde liegenden Mechanismen und das Risiko von dystrophen Verkalkungen und dem Raynaud-Syndrom im Zusammenhang mit der HBO-Therapie besser zu verstehen (Grebeldinger *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Kalziumeinlagerung ebenfalls die AP-Aktivität in Osteoblasten durch die Anwendung der HBO untersucht. Bei normwertiger Knochendichte steigerte die Behandlung mit der HBO die AP-Aktivität signifikant um das Doppelte bis nahezu das Dreifache (Abb. 19). Bei den Osteopenie-Osteoblasten und auch den Osteoporose-Osteoblasten kam es zu einer signifikanten Steigerung der AP um bis zu 70 % durch die HBO im Vergleich zur Behandlung ohne die HBO (Abb. 20, 21). Nach Wu *et al.* konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte AP-Konzentration bei den mit HBO behandelten Osteoblasten gefunden werden. Hier wurde als Nachweis allerdings eine Kossa-Färbung genutzt und es gab einen Nachweis von Knochenknötchen. Die Studie nach Lin SS *et al.* konnte neben einer erhöhten Kalziumeinlagerung auch eine signifikant erhöhte AP-Aktivität in den Osteoblasten nachweisen (Lin *et al.*, 2014). Die osteogene Differenzierung zeigte sich in Studien nach Wu *et al.* im Vergleich zur Kontrollgruppe im Schnitt drei Tage früher (Wu *et al.*, 2007b).

Es ist bekannt, dass RANKL als Ligand für den Transmembranrezeptor RANK gilt. RANKL reguliert hierbei die Osteoklasten, indem es an RANK auf der Oberfläche der Osteoklasten bindet und diese aktiviert. Eine Verschiebung der Knochenhomöostase wie z. B. bei der Osteoporose zeigt eine erhöhte RANKL-Expression und führt z. B. zu einer vermehrten Aktivierung der Osteoklasten, was wiederum zu Knochenabbau führt. Durch OPG kann RANKL vorzeitig gebunden werden und der Mechanismus der Osteoklastenaktivierung bleibt aus. In der vorliegenden Arbeit wurde RANKL bei allen drei Osteoblastengruppen gemessen. Es zeigte sich eine tendenzielle Verringerung des RANKL an Tag 14 in der Gruppe der Osteoporose-Osteoblasten mit HBO (Abb. 32). Zusammenfassend zeigten sich im Hinblick auf RANKL in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Ergebnisse (Abb. 28, 29, 30, 31, 33). Anders war dies bei Al Hadi *et al.*, dort zeigten die Osteoblasten nach vier Tagen mit HBO eine Verringerung des RANKL (Al Hadi *et al.*, 2013). Es konnte herausgefunden werden, dass es durch die tägliche Exposition der Osteoblasten mit der HBO zu einer signifikanten Verringerung der RANKL-induzierten Osteoklastenbildung kam und somit eine Verringerung der Knochenresorption resultierte (Al Hadi *et al.*, 2013). In der Arbeit nach Al Hadi *et al.* wurden die Osteoblasten ebenfalls zu gleichen Bedingungen wie in der hier vorliegenden Arbeit behandelt, jedoch nur über einen Zeitraum von vier Tagen. Eine kürzere Behandlung der

Osteoblasten mit der Hyperbaren Sauerstofftherapie verspricht eine entsprechende Verringerung des RANKL im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, bei der die HBO über 14 bzw. 21 Tage angewandt wurde.

Das Glycoprotein OPG wird als Osteoklasten-Hemmstoff bezeichnet, da es die Differenzierung der Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen verhindert (Li *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte in allen drei Patientengruppen kein erhöhter Nachweis des OPG durch die HBO detektiert werden (Abb. 22-27). Vergleichend konnte bei Vezzani *et al.* bei Hüftkopfnekrosen durch die HBO eine signifikante OPG-Produktion in den Osteoblasten festgestellt werden. Das OPG wurde hier jedoch am Patienten im Serum-Blut erhöht gemessen und ist nicht Ergebnis einer reinen Grundlagenforschung (Vezzani *et al.*, 2017). In einer zusammenfassenden Studie nach Salameh *et al.* zeigte sich, dass der Effekt der HBO auf den RANKL/RANK/OPG-Signalweg bei Patienten mit avaskulärer Nekrose im Hüftkopf eine signifikante Zunahme des löslichen OPGs zeigte (Salameh *et al.*, 2021).
Nach Beth-Tasdogan *et al.* wurde zur Vorbeugung und Behandlung von medikamenteninduzierter Osteonekrose des Kieferknochens die HBO-Therapie genutzt. Ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit konnten auch nach Beth-Tasdogan *et al.* keine signifikanten Ergebnisse in Hinblick auf einen OPG-Anstieg bei HBO gezeigt werden. Dies lag laut eigener Studienkritik nach Beth-Tasdogan *et al.* vor allem an einer zu geringen Teilnehmerzahl, welche eine Uneinheitlichkeit in den Ergebnissen bedingte und ein breites Konfidenzintervall um die Effektschätzung zeigte (Beth-Tasdogan *et al.*, 2017).

In vorherigen Studien zur HBO zeigte sich bei einer zu geringen Sauerstoffkonzentration von 5 % das Ergebnis einer knorpeligen Matrix und bei einer hohen Sauerstoffkonzentration ab 35 % wiederum eine Gewebsdifferenzierung des Knochens. Dass der Sauerstoff neben dem Druck essenziell für die osteogene Differenzierung ist, wird bei Warren *et al.* und Tuncay *et al.* hervorgehoben. Grund hierfür ist, dass die AP-Aktivität und die Produktion von *Transforming growth factor ß* (TGF-ß) direkt beeinflusst wird durch den erhöhten Umgebungsdruck und durch die mit 100 % reinem Sauerstoff angereicherte Umgebungsluft (Tuncay *et al.*, 1994, Warren *et al.*, 2001). Im Vergleich dazu wurden in der hier vorliegenden Arbeit die Osteoblasten mit 100 % reinem $O_2$ und einem Druck von 2,0 bar ü. N. behandelt, welches zu einer vermehrten osteogenen Differenzierung, gemessen an z. B. der Fähigkeit, Kalzium in die EZM einzubauen, führte (Abb. 16, 17). Nach Paderno wurde die HBO bereits bei Osteonekrose im Hüftkopf als Therapieform eingesetzt, auch hier wurde ein Druck von 3,3 bar ü. N.

(≈ 2,4 ata, physikalische Atmosphäre) und 100 % $O_2$ zur Therapie verwendet. Bei der Osteonekrose zeigte sich nach Paderno *et al.* durch die HBO-Therapie eine Verringerung der Entzündungsreaktion, eine Verbesserung der vaskulären Durchblutung und eine Förderung der Gewebsregeneration (Paderno *et al.*, 2021). In vorherigen Studien von Al Hadi *et al.* konnte gezeigt werden, dass 100 % $O_2$ und ein Druck von 3,3 bar ü. N. (≈ 2,4 ata) ein optimales Druck-Gas-Verhältnis für die osteogene Differenzierung darstellt, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf eine zusätzliche Testung hinsichtlich des $O_2$-Gehaltes und des optimalen Drucks verzichtet wurde (Al Hadi *et al.*, 2015). Auch in der Arbeit nach Wu *et al.* konnte durch gleiche Einstellungen der HBO die osteogene Differenzierung in Osteoblasten erhöht bei hyperbarer Therapie detektiert werden (Wu *et al.*, 2007b).
Eine der neuesten Studien von Kaku *et al.* aus dem Jahr 2022 zur funktionellen Regulation von Osteoblasten bei HBO-Behandlung hat von ähnlichen Methoden wie in dieser Arbeit Gebrauch gemacht. Auch hier wurden die Osteoblasten mit der HBO bei 2,5 bar ü. N. mit 100 % $O_2$ für 90 min behandelt. Die Behandlung erfolgte hier jedoch im Vergleich zur vorliegenden Arbeit jeden Tag über einen Zeitraum von 28 Tagen. Es wurden die AP und das Kalzium gemessen. Zudem wurde die mRNA-Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF), des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (HIF-1α), des Typ-1-Kollagens (COL1) und des Osteocalcins (OCN) analysiert. Weitergehend konnte eine ATP-Konzentration mit Lebensfähigkeitstest bestimmt werden. Wie auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte AP-Aktivität und eine erhöhte Kalziumbildung nachgewiesen werden. COL1, bFGF und OCN wurden durch die HBO erhöht exprimiert, VEGF und HIF-1α waren in der HBO-Gruppe signifikant reduziert. Der ATP-Spiegel war signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusammenfassend wurde also herausgefunden, dass die HBO die Knochenbildung beschleunigt, hier wurde die ATP-Konzentrationserhöhung durch die HBO in den Osteoblasten als Ursache diskutiert (Kaku *et al.*, 2022).

Im Rahmen der Arbeit wurde zusätzlich der Einfluss des Drucks durch die HBO auf den pH-Wert des Mediums untersucht, da nach Monfoulet *et al.* eine Beeinflussung der Osteoblasten in basischem Medium beschrieben wurde (Monfoulet *et al.*, 2014).
Nach Monfoulet *et al.* kann es durch den erhöhten Druck in der HBO (2 bar ü. N.) zu einer Alkalisierung des Differenzierungsmediums kommen. Diese Alkalisierung führt laut der Studie zu einer Verminderung der osteogenen Differenzierung. Um den Einfluss des pH-Wertes auf die osteogenen Differenzierungspotenziale zu bewerten, wurden in der Studie nach

Monfoulet *et al.* Knochenstrukturen verwendet, die aus humanen mesenchymalen Stammzellen (hBMSCs) in Kombination mit bioaktivem Glas (BG) hergestellt wurden. Die AP-Aktivität und auch die Mineralisierung waren stark vom pH-Wert des Zellkulturmediums abhängig. Ein alkalischer pH-Wert über 7,9 hat sowohl die osteogene Differenzierung als auch den Mineralisierungsprozess nachhaltig beeinflusst. Die Osteogenese nahm um das 20 bis 30-fache ab, wenn der pH-Wert von 7,5 auf 7,8 stieg. Sie wurde komplett gehemmt bei einem pH-Wert von 8. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass in einem Bereich von 7,9 - 8,27 die Proliferation nicht beeinflusst, jedoch die osteogene Differenzierung der Zellen gehemmt wurde (Monfoulet *et al.*, 2014).

Mit Hilfe eines pH-Experiments wurde in der hier vorliegenden Arbeit der Einfluss des pH-Wertes auf die osteogene Differenzierung der Osteoblasten untersucht. In dem pH-Versuch konnte, anders als in Monfoulet *et al.* beschrieben, gezeigt werden, dass der pH-Wert nicht signifikant durch die HBO beeinflusst wird und somit die Osteoblasten nicht in ihrer osteogenen Differenzierung gehemmt werden (Abschnitt 3.2.8). Osteoblasten des gleichen Spenders wurden insgesamt in drei Gruppen eingeteilt und mit unterschiedlichen pH-Wert-Medien behandelt bzw. mit der HBO. Hier konnte demonstriert werden, dass die Fähigkeit, Kalzium in die EZM einzubauen, durch die HBO signifikant gesteigert werden konnte. Im Vergleich hatte das basische Medium keinen fördernden Effekt auf die osteogene Differenzierung der Osteoblasten. Dementsprechend hat die HBO zwar einen nachweisbaren Einfluss auf den pH-Wert des Mediums der Osteoblasten, jedoch ist die osteogene Differenzierung durch diesen Versuch nachweislich nicht durch den pH-Wert beeinflusst.

Im Medium der vorliegenden Arbeit wurde HEPES als Puffer zum OM zugesetzt, um den Einfluss des pH-Wertes weiterhin zu minimieren. Auch bei Monfoulet *et al.* hat sich der Einfluss von HEPES als Abpufferungsmechanismus auf den alkalischen pH-Wert des Mediums positiv gezeigt (Monfoulet *et al.*, 2014).

Bei älteren Patienten wird nach Frakturgeschehen wie z. B. bei Oberschenkelhalsfraktur oftmals eine Prothese eingesetzt. Auch in der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Osteoblasten aus Patienten nach Oberschenkelhalsfraktur, die nachfolgend mit einer Totalendoprothese (TEP) versorgt wurden. Es ist bekannt, dass eine Rehabilitation bei älteren Patienten nach Frakturgeschehen oft vor allem nach Protheseneinsatz langwierig ist und an dieser Stelle die HBO angreifen kann (Grassmann *et al.*, 2015). Es gibt Studien im Tiermodell, die zeigen, dass es durch die HBO zu einer schnelleren Verbindung zwischen autologen Knochentransplantaten und somit zu einer schnelleren Protheseneinheilung kommt. In der

Studie von Okubo *et al.* wurde in den Wadenmuskel von Ratten das rekombinante menschliche knochenmorphologische Protein-2 (rhBMP-2) in Verbindung mit Atelopeptid-Typ-I-Kollagen implantiert und es kam zu einer signifikanten Erhöhung der osteogenen Parameter in Form einer signifikanten Erhöhung der AP und des Kalziums. Dementsprechend fand diese Arbeitsgruppe heraus, dass die HBO die Aktivität und Osteoinduktion durch Implantation von rhBMP-2 signifikant fördert (Okubo *et al.*, 2001).

In weiteren Studien konnte herausgefunden werden, dass die autologe Knochentransplantation im Tiermodell durch die HBO eine signifikant schnellere Vereinigung des Tierknochens und des Transplantats durch erhöhte osteogene Differenzierung bedingt (Sawai *et al.*, 1996, (Grassmann *et al.*, 2015).

Um an die Relevanz der oben aufgeführten Arbeiten von Sawai et al, Okubo *et al.* und Grassmann *et al.* anzuknüpfen, ist es wichtig zu wissen, dass die Osteoblasten in der vorliegenden Arbeit vor allem aus Hüftköpfen von Patienten nach einem stattgehabten Oberschenkelhalsbruch extrahiert wurden. Die Hüftköpfe wurden dabei intraoperativ entnommen und eine Prothese (Hüft-Totalendoprothese (Hüftpfanne, Kopf und Schaft) oder Duokopfprothese (Duokopf und Schaft)) implantiert, sodass die Osteoblasten aus den Hüftköpfen zur Forschung bei dieser Arbeit dienen konnten. Hier sind die bisherigen Erkenntnisse über die Induktion eines schnelleren Protheseneinwachsens aus o. g. Literatur relevant und können vor allem für zukünftige Arbeiten, die auf die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit aufbauen sollen, von Bedeutung sein. Damit eine neue Prothese stabil in den Knochen einwachsen kann, wäre die Verwendung der HBO ein wichtiger Zugewinn in der Rehabilitationsphase bei älteren Patienten. Im Vergleich zu der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HBO durch eine Erhöhung der Zytokine eine erhöhte Knochenstabilität und Knochenbildung bedingt. Dies äußert sich in einer schnelleren Verbindung von autologen Knochentransplanten und Titanprothesen, sowie der höheren Angiogenese zur besseren Sauerstoffversorgung des Knochens.

Bei dieser Arbeit ist bei jedem Patienten eine DXA-Messung vorausgegangen, um die Knochendichte zu bestimmen und die Patienten in die Gruppen normwertige Knochendichte, Osteopenie und Osteoporose einzuteilen. Um zu erkennen, welchen Einfluss die HBO auf die unterschiedlichen Knochendichten hat, war eine vorherige Einteilung essenziell. In den Studien, die bisher zur HBO und Knochenstabilität entstanden, sind keine DXA-Messungen vorangegangen und somit wurde die Knochendichte der Versuchstiere nicht bestimmt. Das Ziel sollte es zukünftig sein, dass diese Arbeit mit folgenden Experimenten zum Einfluss der HBO auf Osteoblasten von humanen Knochen mit Osteopenie oder Osteoporose gestützt wird und

weiter ausgebaut wird, um z. B. auch die Verbindung von Frakturheilung und Osteopenie-Osteoblasten bzw. Osteoporose-Osteoblasten näher zu untersuchen. Somit soll herausgefunden werden, welchen Effekt die Therapie auf die unterschiedlichen Knochenqualitäten hat und bei welcher Knochenqualität signifikante Ergebnisse gezeigt werden können.

Im Abschnitt zu den Auswirkungen der HBO auf die osteogene Differenzierung bei Osteoblasten von älteren Patienten ist schlussendlich die klinische Umsetzung der Hyperbaren Sauertstofftherapie zu überlegen. Die momentan zur Verfügung stehenden HBO-Kammern in Deutschland sind auf eine Anzahl von ca. 30 Stück limitiert, sodass man nicht allen Patienten eine Behandlung nach dem Frakturgeschehen zeitnah zukommen lassen kann. Außerdem ist es mit einem erhöhten logistischen Aufwand verbunden (Wiese *et al.* 2006). Es könnte eine Überlegung sein, bei elektiven Patienten mit z. B. Arthrose im Hüftgelenk eine präoperative DXA-Messung durchzuführen, um diese postoperativ mit der HBO zu behandeln. Dies ist jedoch mit zusätzlichem Aufwand verbunden, sodass sich die Frage einer Kostenübernahme durch die Krankenkassen stellt. Zusätzlich ist die Strahlenbelastung gegenüber dem Patienten zu erwähnen, die durch die DXA-Messung ausgeht.

## 5.2. Auswirkungen der additiven Behandlung mit dem Antioxidans Katalase auf die osteogene Differenzierung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde auch die Auswirkung des Antioxidans Katalase auf die osteogene Differenzierung bei normwertigen Osteoblasten, Osteopenie- und Osteoporose-Osteoblasten untersucht.

Katalase ist ein Antioxidans. Antioxidantien sind Moleküle, welche Zellen und Gewebe wie z. B. Osteoblasten vor oxidativen Schäden durch ROS und freie Radikale schützen. Die schädlichen Moleküle werden durch die Antioxidantien neutralisiert und es wird verhindert, dass Schäden an Zellstrukturen wie z. B. Proteinen, Lipiden oder der DNA entstehen können. Antioxidantien können zudem freie Radikale abfangen, indem sie ihnen ein freies Elektron spenden und sie dadurch stabilisieren. Sie können mit anderen Antioxidantien regenerieren oder oxidative Enzyme wie z. B. die NADPH-Oxidase hemmen oder an Eisen oder Kupfer binden, um schädliche ROS zu katalysieren (An *et al.*, 2019). Die Studie von An *et al.* beschreibt, wie Knochenzellen durch oxidativen Stress geschädigt werden und es somit zu einem Ungleichgewicht beim Knochenumbau kommt. ROS erhöhen die Osteoklastenaktivität und verringert die Osteoblastenaktivität, was zu einem Nettoverlust der Knochenmasse und

Knochenstärke und somit zu einer Osteoporose führt (An *et al.*, 2019). $H_2O_2$ ist an vielen biologischen Prozessen, wie z. B. dem *NFκ-B* -Signalweg und der Regulation der Apoptose, beteiligt. Neben der Fähigkeit des enzymatischen Abbaus von $H_2O_2$ kann Katalase auch peroxidatorisch wirken, z. B. bei der Zersetzung von kleinen Substraten wie Methanol, Azid und Hydroperoxiden (Glorieux and Calderon, 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Osteoblasten von älteren Patienten gearbeitet, dementsprechend zeigte sich oxidativer Stress, welcher durch Alterungsprozesse und Erkrankungen wie z. B. Osteoporose entsteht, als essenzieller Forschungspunkt (Liguori *et al.*, 2018, Geng *et al.*, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurde oxidativer Stress in Form von $H_2O_2$ zugeführt, in Form von $H_2O_2$, um den Einfluss auf die Osteoblasten in Verbindung mit der HBO und Katalase zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Neutralisierung der Wirkung von $H_2O_2$ auf die Osteoblasten durch die Katalase kommt. Dies zeigte sich in Form einer vermehrten Kalziumeinlagerung in die EZM (Abb. 16) sowie einer Erhöhung der AP, im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit $H_2O_2$ und ohne Katalase (Abb. 19).

In dem Artikel von An *et al.* wurden ebenfalls Antioxidantien wie z. B. Vitamin C, Vitamin E, Glutathion, Selen und Flavinoide untersucht. Auch spezifisch auf die Osteoporose wurden in dieser Studie Resveratrol, Curcumin und Alpha-Liponsäure herangezogen, mit dem Ergebnis, dass Antioxidantien eine wichtige Säule zur Vorbeugung und Behandlung der Osteoporose darstellen, da oxidativer Stress reduziert wird. Eine antioxidative Therapie in Kombination mit anderen Osteoporose-Behandlungen (z. B. Bisphosphonaten) sollte durchgeführt werden (An *et al.*, 2019). Auch nach Zhou *et al.* wird eine potenzielle therapeutische Wirkung von Antioxidantien (z. B. Vitamin C, Vitamin E, Selen und Phenole) bei postmenopausaler Osteoporose diskutiert. In dieser Studie wurden bei postmenopausalen Frauen erhöhte Homocystein- (Hcy) und Stickstoffmonoxidwerte (NO) im Blut nachgewiesen (Zhou *et al.*, 2016). NO gilt als wichtiger Regulator des Knochenstoffwechsels und Hcy als wichtige Komponente im Knochenstoffwechsel und es ist bei osteoporotischen Frakturen erhöht nachweisbar (Leboff *et al.*, 2009, McLean *et al.*, 2004, van Meurs *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass ein erhöhtes Risiko für eine postmenopausale Osteoporose vor allem mit einem erhöhten Hcy-Wert zusammenhängt. Das antioxidative System soll zu einer Verringerung des Frakturrisikos beitragen können (Zhou *et al.*, 2016).

Ein weiteres Problem ist die optimale Dosisfindung der Antioxidantien zur Behandlung am Menschen. Eine falsche Dosis bei z. B. Vitamin E und ß-Carotin könnte für den Patienten das Risiko von gewissen Gesundheitsproblemen wie z. B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder auch Lungenkrebs erhöhen (Zhou *et al.*, 2016).

In der Metaanalyse nach Zhou *et al.* wird das körpereigene antioxidative Enzym Superoxiddismutase (SOD) als Schutz vor oxidativen Schäden erwähnt. Als eine Art natürliche Abwehrkraft gegen ROS kann es eine Umwandlung von Superoxidradikalen in Wasserstoffperoxid katalysieren. Eine verminderte Aktivität der SOD wurde z. B. bei Alterungsprozessen oder auch bei Patienten mit Osteoporose beobachtet, dadurch kann es wiederum zu vermehrtem oxidativem Stress kommen und somit wird die Osteoporose verschlimmert (Zhou *et al.*, 2016). Katalase wandelt Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um, die SOD wandelt Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um (Weydert and Cullen, 2010).
Nach Glorieux *et al.* kann Katalase die Dismutation von $H_2O_2$ in Sauerstoff und Wasser ohne Verbrauch von Reduktionsäquivalenten hervorrufen und somit die Zellen gegen oxidative Schäden schützen. Die erste Reaktion ist laut der Studie eine Oxidation des Häm-Proteins durch ein $H_2O_2$-Molekül, welches zur Bildung von einem Oxoferryl-Porphyrin-Kationenradikal führt. Sobald dieses Radikal gebildet ist, reagiert es schnell mit einem zweiten Wasserstoffperoxidmolekül, um Wasser und Sauerstoff in einem Zwei-Elektronen-Redoxprozess zu erzeugen.

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$$

Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit wird Katalase dort also ebenfalls zur Behandlung von oxidativem Stress in Form von $H_2O_2$ peroxidatorisch eingesetzt. Die Wirkung von Katalase auf $H_2O_2$ konnte vor allem in der Abb. 16 in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Es zeigten sich auf Grundlage von z. B. Sahlender *et al.*, welche sich mit der Wirkung von Katalase auf das osteogene Differenzierungspotenzial beschäftigen, Anknüpfungspunkte für die hier vorliegende Arbeit und ähnliche Ergebnisse (Sahlender *et al.*, 2022).
Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, reifen Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) heran, genauso wie adipöse mesenchymale Stammzellen (ASCs). In einer Studie nach Sahlender *et al.* wurden ASCs untersucht und in zwei Gruppen eingeteilt. Die *Non-Responder*-ASCs (NR-ASCs) beinhalteten ASCs mit verzögerter Osteogenese, z. B. aufgrund von altersbedingten Störungen und erhöhter intrazellulärer Erzeugung von ROS. Die *Responder*-ASCs (R-ASCs) beinhalteten ASCs, welche eine normwertige osteogene Differenzierung zeigten (Kontrolle). Beide Gruppen wurden bezüglich ihres osteogenen Differenzierungspotenzials (ODP) untersucht.

In der Studie wurden AP und Alizarinrot-S, ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit, zur Untersuchung der MSCs herangezogen. Sie zeigten signifikante Ergebnisse im Hinblick auf die osteogene Differenzierung und die AP-Aktivität bei der *Non-Responder*-Gruppe (NR-ASCs). Es konnte gezeigt werden, dass bei den NR-ASCs (höheres Alter, signifikant erhöhte ROS) eine signifikant niedrigere AP-Konzentration vorlag als in der Gruppe der *Responder* (normwertige MSCs). Durch die Verwendung der Katalase konnte die AP-Aktivität und ebenfalls das osteogenen Differenzierungspotenzial signifikant angehoben werden (Sahlender *et al.*, 2022). In der vorliegenden Arbeit wurde Katalase ebenfalls als Antioxidans bei Osteoblasten von älteren Patienten vor dem Hintergrund der Wirkung auf ROS untersucht. Als Übersicht dienen hierfür Abb. 14 und 15, welche die Wirkung von Katalase mit und ohne HBO im Hinblick auf die Kalziumeinlagerung in die EZM zeigen. Bei normwertiger Knochendichte kam es zur Verdopplung der Kalziumeinlagerung durch Katalase und es zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Kalziumeinlagerung bei Osteopenie (Abb. 16,17). Durch die Behandlung mit der HBO in Kombination mit Katalase wurde das ODP ebenfalls erhöht. Auch die AP ist unter der Behandlung mit Katalase bei Osteoblasten gestiegen, jedoch nicht signifikant (Abb. 19-21). Die AP konnte auch in der Studie von Sahlender *et al.* bei Katalase-Zugabe erhöht nachgewiesen werden, jedoch war hier der Effekt in der Studie signifikant.
Da das osteogene Differenzierungspotenzial nach Sahlender *et al.* mit dem Grad des intrazellulären oxidativen Stresses zu korrelieren schien, wurde der Einfluss des oxidativen Stresses in Form von $H_2O_2$ auf das ODP wie in der vorliegenden Arbeit untersucht. Geringe Konzentrationen von $H_2O_2$ hoben hierbei das ODP an, höhere Dosen jedoch senkten es stark (Sahlender *et al.*, 2022). In der hier vorliegenden Arbeit konnte sichtbar die Wirkung des $H_2O_2$ durch die Katalase abgeschwächt werden, welches sich messbar mit einer Erhöhung des Kalziums von mehr als 81,1 % zeigte und die Ergebnisse von Sahlender *et al.* unterstreicht (Abb. 16).

Es ist bereits bekannt, dass RANKL vor allem bei postmenopausalen Frauen mit verringerter Knochendichte ein erhöhtes Level aufzeigt und OPG bei diesen Frauen verringert nachzuweisen ist (Azizieh *et al.*, 2019). Ebenfalls ist bekannt, dass die Katalase- und Glutathionperoxidase-Aktivität bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose verringert ist (Ozgocmen *et al.*, 2007a, Ozgocmen *et al.*, 2007b). Vergleicht man diese Erkenntnisse nun, ist anzunehmen, dass eine Verbesserung der Knochendichteminderung eventuell durch eine Erhöhung der Katalase-Level erreicht werden kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der

Einfluss von Katalase sowohl auf OPG als auch auf RANKL in den Patientengruppen normwertiger Knochendichte, Osteopenie- und Osteoporose-Osteoblasten untersucht. Hierbei zeigte sich bei der Osteoporose eine signifikante Senkung des RANKL an Tag 14 durch die Behandlung mit der Katalase (Abb. 32). In den Gruppen normwertige Knochendichte und Osteopenie zeigte sich keine signifikante Senkung des RANKL durch die Katalase (Abb. 28, 29, 30, 31). Beim OPG kam es lediglich an Tag 21 bei den Osteopenie-Osteoblasten zu einem tendenziellen Anstieg des OPG unter Katalase (Abb. 25), jedoch kam es zu keiner Veränderung durch die Katalase bei der normwertigen Knochendichte und Osteoporose (Abb. 22, 23, 26, 27). Demnach kann es eventuell durch die Katalase-Erhöhung nur zu einem bedingten Einfluss auf die Osteogenese kommen. Weitere Faktoren zur Verbesserung der Homöostase in Hinsicht auf den RANKL/RANK/OPG-Signalweg sollten herangezogen werden.

Zusammenfassend konnte in der hier beschriebenen Arbeit eine erhöhte osteogene Differenzierung durch die Verwendung der Katalase in den drei Patientengruppen (normwertige Knochendichte, Osteopenie, Osteoporose) nachgewiesen werden. In Verbindung mit der HBO konnten zum Teil eine signifikante Erhöhung der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass die Funktion der Osteoblasten bei Osteoporose und bei Osteopenie stark eingeschränkt wird. Bei der Katalase bei diesen beiden Gruppen kann nur ein geringerer Effekt erzielt werden im Vergleich zu den Osteoblasten mit normwertiger Knochendichte.

## 5.3. Schlussfolgerung und Abschlussbetrachtung

### 5.3.1. Auswirkungen der HBO auf die Differenzierung und Funktion Osteoporose-relevanter Parameter in humanen Osteoblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) anhand von drei Patientengruppen untersucht: Normwertige Knochendichte, Osteopenie- und Osteoporose-Osteoblasten. Ein besonderer Fokus lag auf der Osteogenese und auf Osteoporose-relevanten Parametern in Osteoblasten älterer Patienten. In der vorliegenden Arbeit konnte insgesamt eine Erhöhung der Osteogenese von Patienten mit normwertiger Knochendichte und Osteopenie untersucht werden. In unterschiedlichen Studien wurde demzufolge ein erhöhtes Protheseneinwachsen durch ähnliche Ergebnisse mit signifikanter Kalziumerhöhung und AP-Aktivität detektiert (Abb. 16, 19) (Okubo *et al.*, 2001, Grassmann *et al.*, 2015, Sawai *et al.*,

1996). Diese Ergebnisse können anknüpfend an die vorliegende Arbeit verwendet werden, um Rückschlüsse auf die HBO und die Protheseneinheilung zu erzielen.

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Wirkung der Hyperbaren Sauerstofftherapie in Bezug auf die Osteoblasten von älteren Patienten. In vorherigen Arbeiten konnte eine positive Wirkung auf die osteogene Differenzierung von Osteoblasten bei Kieferknochennekrose nachgewiesen werden (Grbic *et al.*, 2008). Durch eine Erhöhung der osteogenen Differenzierung erhofften wir uns, dem Abbauprozess der Osteoporose entgegenwirken zu können bzw. ein Voranschreiten der Abbauprozesse zu verhindern. Weiterhin erhofften wir uns, nach einem Frakturgeschehen durch die HBO zu einer schnelleren Rehabilitation zu verhelfen. Eine tendenzielle Verringerung des RANKL zeigte sich in den Experimenten in der vorliegenden Arbeit bei den Osteoporose-Osteoblasten, was mit einer Verminderung der knochenabbauenden Prozesse einhergeht (Abb. 32). Nach Al Hadi *et al.* sollten die Versuche in Hinblick auf RANKL lediglich über eine 4-tägige Behandlung erfolgen, um signifikante Ergebnisse durch die HBO zu erzielen, weshalb eine Verminderung der Versuchszeit ein Ansatz für weiterführende Versuche zeigt (Al Hadi *et al.*, 2013).

Ein Osteogenese-hemmender Einfluss der HBO (Monfoulet *et al.*) auf die Osteoblasten konnte in der hier vorliegenden Arbeit durch einen pH-Versuch nicht bestätigt werden. Ebenfalls lieferten Ergebnisse von Tuncay *et al.* und Warren *et al.* direkte Erkenntnisse über den Einfluss des Umgebungsdrucks und der mit 100 % $O_2$ angereicherten Luft, welche in der vorliegenden Arbeit angewandt werden konnten (Tuncay *et al.*, 1994, Warren *et al.*, 2001).

### 5.3.2. Auswirkungen von Katalase auf die Differenzierung und Funktion Osteoporose-relevanter Parameter in humanen Osteoblasten

Der Einfluss von Katalase als Antioxidans sollte in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der HBO auf die osteogene Differenzierung und die Osteoporose-relevanten Parameter ebenfalls betrachtet werden. Es sollten vor allem Osteoblasten von älteren Patienten untersucht werden, also spielten oxidativer Stress und Alterungsprozesse eine größere Rolle (Liguori *et al.*, 2018, Geng *et al.*, 2019). In Zusammenschau mit vorherigen Ergebnissen von Sahlender *et al.* zu Katalase und MSCs konnte die Wirkung der Katalase als signifikante Steigerung der Osteogenese nochmals bestätigt werden (Sahlender *et al.*, 2022). Bei normwertiger Knochendichte zeigte sich eine signifikant erhöhte Kalziumeinlagerung in die EZM durch die Katalase (Abb. 16). Es kam zu einer Steigerung der AP bei Patienten mit normwertiger

Knochendichte, welche sich jedoch nicht als signifikant herausstellte (Abb. 19). Die Osteoporose-relevanten Parameter wurden durch die Katalase nicht beeinflusst (Abb. 22, 23, 28,29).
Bei Osteopenie konnte eine tendenzielle Steigerung der Kalziumeinlagerung in EZM durch die Katalase im Vergleich ohne Verwendung der Katalase gezeigt werden (Abb. 17). Gleiches zeigte sich bei der osteogenen Differenzierung anhand der Alkalischen Phosphatase (Abb. 20). Bei den Osteoblasten von Osteoporose-Patienten hatte die Katalase keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung (Abb. 18 und 21).

## 5.4. Limitationen und methodische Selbstkritik

Durch die hier beschriebene Arbeit konnte erstmals der Einfluss der HBO auf humane Osteoblasten von älteren Patienten *in vitro* untersucht werden. Es können Aussagen über das osteogene Differenzierungspotenzial bei unterschiedlichen Knochendichten im Hinblick auf eine Therapie mittels HBO und/ oder Katalase getroffen werden. Um allerdings eine verlässliche Aussage über das osteogene Differenzierungspotenzial und die Osteoporose-relevanten Parameter sowohl bei normwertiger Knochendichte, Osteopenie als auch bei Osteoporose treffen zu können, ist eine Erhöhung der Fallzahl zu empfehlen. Durch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Anzahl an Osteoblasten konnte ein erster Einblick zur Wirkung der HBO auf Osteoblasten gegeben werden. Zudem konnten die Osteogenese in den unterschiedlichen Knochendichten erfasst und Hinweise zu den Osteoporose-relevanten Parametern gesammelt werden. Für tiefergreifende Informationen über die Osteogenese der Osteoblasten unter HBO-Therapie und Katalase-Einfluss sind weiterführende Studien notwendig. Eine weitere Limitation stellt die Zusammensetzung der Osteoblastenspender dar. In allen drei Behandlungsgruppen hat sich eine Tendenz zu eher weiblichen Spendern gezeigt. Wahrscheinliche Gründe hierfür sind die erhöhte Osteoporoseneigung im Alter bei der Frau und steigendes Alter im demografischen Wandel vor allem beim weiblichen Geschlecht, sowie ein erhöhtes Frakturrisiko (Zhou *et al.*, 2016). Zudem sollten weitere Vorerkrankungen der Patienten und Patientinnen in folgenden Studien berücksichtigt werden, da auch diese einen signifikanten Einfluss auf die Knochendichte und die Wirkung der Behandlung auf die Osteoblasten haben könnten.

Die vorliegende Arbeit konnte erste Aussagen darüber tätigen, wie sich humane Osteoblasten abhängig von der Knochendichte unter der HBO verhalten. In der bisherigen Literatur wurde die HBO nur im Hinblick auf Osteoblasten mit normwertiger Knochendichte untersucht, nicht

jedoch bei Patienten mit einer Osteopenie oder Osteoporose. Zudem wurde die additive Behandlung mit dem Antioxidans Katalase bei unterschiedlichen Knochendichten bisher nicht hinreichend in der Literatur beschrieben.

Um eine klinische Anwendung dieser Verfahren zu ermöglichen, sind weitere Studien zum OPG/RANK/RANKL-Signalweg bei Osteoporose und der Interaktion von hyperbarem Sauerstoff und Katalase notwendig. Zudem könnten auch andere Antioxidantien weitergehend zur Wirkung bei Osteoporose untersucht werden.

Ebenfalls sollte eine genauere Untersuchung der Wirkung von der HBO und Katalase auf den Signalweg von OPG und RANKL, sowie RANK vor einer *in-vivo*-Testung erfolgen. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Ergebnisse zeigen eine Erhöhung von OPG und Verminderung des RANKL bei Auslassen der HBO. Bei Verwendung der HBO kam es dementsprechend zu einer Verminderung der OPG-Expression und Erhöhung des RANKL (Abb. 22-33). Die genaue Ursache sollte näher analysiert werden.

Ein Zellmodell so wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, könnte im nächsten Schritt mit einem Tiermodell ergänzt werden. Tiermodelle können vergleichbare Ergebnisse aufgrund einer standardisierten Vorgehensweise erreichen. Es ist zu diskutieren, ob die im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen sind. An Ratten wurden Osteoblasten-Studien durchgeführt, jedoch bisher nur mit normwertiger Knochendichte (Okubo *et al.*, 2001). Ein weiterer Schritt wäre, bei Ratten eine Osteopenie und Osteoporose hervorzurufen (z. B. durch Hysterektomie, Injektionen von ROS). Hier könnte weitergehend der OPG/RANKL/RANK-Signalweg untersucht und Erkenntnisse für die HBO-Forschung gewonnen werden. Es kann jedoch nur eine begrenzte Aussage durch die Übertragung der Tierversuche auf das humane System getroffen werden. Zudem sollte im nächsten Schritt die Untersuchung der HBO im Hinblick auf Frakturgeschehen und Prothesenersatz am Tiermodell bei Osteoporose und Osteopenie näher analysiert werden.

## 5.5. Ausblick

Die Hyperbare Sauerstofftherapie ist ein in vielen Fachdisziplinen wie z. B. der Plastischen Chirurgie oder Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bereits genutzter therapeutischer Ansatz. Hier wird durch die vermehrte Anreicherung des Gewebes mit $O_2$ eine Reduktion der ROS hervorgerufen und Entzündungsprozesse werden reduziert, sodass es zu einer Erholung des Gewebes kommen kann (Khan, 2015, Bosco *et al.*, 2018, Smolle *et al.*, 2021).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die osteogene Differenzierung und den Einfluss auf Osteoporose-relevante Parameter in humanen Osteoblasten von Patienten mit verschiedenen Knochendichten sind von hoher Relevanz für zukünftige Therapieansätze neben den bereits bestehenden Behandlungsmöglichkeiten wie z. B. Bisphosphonaten. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass die HBO bei älteren Patienten mit normwertiger Knochendichte sowie bei Patienten mit einer Osteopenie eine zusätzliche Therapieoption darstellen könnte. Es sollte vor einer Behandlung mit der HBO immer eine DXA-Messung erfolgen, um die Knochendichte des jeweiligen Patienten zu berücksichtigen und einen wirklichen Benefit für den Patienten durch die Therapie zu finden.

Bei weitergehenden Studien am Tiermodell und später am Menschen kann eine Übertragung der aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erfolgen. Eine beschleunigte Heilung nach Frakturgeschehen oder eine beschleunigte Knochen-Implantat-Heilung nach Protheseneinsatz wäre demnach das Ziel, welches durch die zusätzliche Behandlung mit der HBO und mit Katalase erreicht werden könnte. Zusätzlich könnte die HBO in Kombination mit der Katalase in Zukunft auch als präventiver Ansatz zur Knochenstärkung durch vermehrte osteogene Differenzierung Anwendung finden.

# 6. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

AL HADI, H., SMERDON, G. R. & FOX, S. W. 2013. Hyperbaric oxygen therapy suppresses osteoclast formation and bone resorption. *J Orthop Res,* 31**,** 1839-44.

AL HADI, H., SMERDON, G. R. & FOX, S. W. 2015. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation. *J Dent,* 43**,** 382-8.

ALMELING, M., WELSLAU, W. 1996. *Hyperbare Sauerstofftherapie – Qualitätsstandards, Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM) e.V.,* Kiel, Archimedes.

AN, Y., ZHANG, H., WANG, C., JIAO, F., XU, H., WANG, X., LUAN, W., MA, F., NI, L., TANG, X., LIU, M., GUO, W. & YU, L. 2019. Activation of ROS/MAPKs/NF-κB/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast-mediated diabetic osteoporosis. *Faseb j,* 33**,** 12515-12527.

AZIZIEH, F. Y., SHEHAB, D., JARALLAH, K. A., GUPTA, R. & RAGHUPATHY, R. 2019. Circulatory Levels of RANKL, OPG, and Oxidative Stress Markers in Postmenopausal Women With Normal or Low Bone Mineral Density. *Biomark Insights,* 14**,** 1177271919843825.

BELIBASAKIS, G. N., MEIER, A., GUGGENHEIM, B. & BOSTANCI, N. 2011. Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells. *Microb Pathog,* 50**,** 6-11.

BETH-TASDOGAN, N. H., MAYER, B., HUSSEIN, H. & ZOLK, O. 2017. Interventions for managing medication-related osteonecrosis of the jaw. *Cochrane Database Syst Rev,* 10**,** Cd012432.

BLACK, D. M., KELLY, M. P., GENANT, H. K., PALERMO, L., EASTELL, R., BUCCI-RECHTWEG, C., CAULEY, J., LEUNG, P. C., BOONEN, S., SANTORA, A., DE PAPP, A. & BAUER, D. C. 2010. Bisphosphonates and fractures of the subtrochanteric or diaphyseal femur. *N Engl J Med,* 362**,** 1761-71.

BOSCO, G., VEZZANI, G., MRAKIC SPOSTA, S., RIZZATO, A., ENTEN, G., ABOU-SAMRA, A., MALACRIDA, S., QUARTESAN, S., VEZZOLI, A. & CAMPORESI, E. 2018. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates osteonecrosis in patients by modulating inflammation and oxidative stress. *J Enzyme Inhib Med Chem,* 33**,** 1501-1505.

BOYCE, B. F. & XING, L. 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy,* 9 Suppl 1**,** S1-S1.

BOYCE, B. F. & XING, L. 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics,* 473**,** 139-146.

BOYCE, B. F., XING, L. & CHEN, D. 2005. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab,* 2**,** 344-5.

CARDWELL, C. R., ABNET, C. C., CANTWELL, M. M. & MURRAY, L. J. 2010. Exposure to oral bisphosphonates and risk of esophageal cancer. *Jama,* 304**,** 657-63.

CHEN, X., WANG, Z., DUAN, N., ZHU, G., SCHWARZ, E. M. & XIE, C. 2018. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res,* 59**,** 99-107.

CUMMINGS, S. R., BLACK, D. M., THOMPSON, D. E., APPLEGATE, W. B., BARRETT-CONNOR, E., MUSLINER, T. A., PALERMO, L., PRINEAS, R., RUBIN, S. M., SCOTT, J. C., VOGT, T., WALLACE, R., YATES, A. J. & LACROIX, A. Z. 1998. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *Jama,* 280**,** 2077-82.

ERIKSEN, E. F. 2012. Treatment of osteopenia. *Rev Endocr Metab Disord,* 13**,** 209-23.

ERIKSEN, E. F., LYLES, K. W., COLÓN-EMERIC, C. S., PIEPER, C. F., MAGAZINER, J. S., ADACHI, J. D., HYLDSTRUP, L., RECKNOR, C., NORDSLETTEN, L.,

LAVECCHIA, C., HU, H., BOONEN, S. & MESENBRINK, P. 2009. Antifracture efficacy and reduction of mortality in relation to timing of the first dose of zoledronic acid after hip fracture. *J Bone Miner Res,* 24**,** 1308-13.

FRANCIS, J. 2002. Decompression sickness. *Emerg Med (Fremantle),* 14**,** 358-63.

GANANÇA, F. F., GAZZOLA, J. M., GANANÇA, C. F., CAOVILLA, H. H., GANANÇA, M. M. & CRUZ, O. L. 2010. Elderly falls associated with benign paroxysmal positional vertigo. *Braz J Otorhinolaryngol,* 76**,** 113-20.

GENG, Q., GAO, H., YANG, R., GUO, K. & MIAO, D. 2019. Pyrroloquinoline Quinone Prevents Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis by Inhibiting Oxidative Stress and Osteocyte Senescence. *Int J Biol Sci,* 15**,** 58-68.

GLORIEUX, C. & CALDERON, P. B. 2017. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem,* 398**,** 1095-1108.

GORDILLO, G. M. & SEN, C. K. 2003. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *Am J Surg,* 186**,** 259-63.

GRASSMANN, J. P., SCHNEPPENDAHL, J., HAKIMI, A. R., HERTEN, M., BETSCH, M., LÖGTERS, T. T., THELEN, S., SAGER, M., WILD, M., WINDOLF, J., JUNGBLUTH, P. & HAKIMI, M. 2015. Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects. *J Orthop Res,* 33**,** 513-20.

GRBIC, J. T., LANDESBERG, R., LIN, S. Q., MESENBRINK, P., REID, I. R., LEUNG, P. C., CASAS, N., RECKNOR, C. P., HUA, Y., DELMAS, P. D. & ERIKSEN, E. F. 2008. Incidence of osteonecrosis of the jaw in women with postmenopausal osteoporosis in the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly pivotal fracture trial. *J Am Dent Assoc,* 139**,** 32-40.

GREBELDINGER, S. P., TOMIĆ, J. M., VIJATOV-DJURIĆ, G. V., RADOJCIĆ, B. S., VUCKOVIĆ, N. M. & CULAFIĆ, J. N. 2014. Dystrophic calcifications and Raynaud's phenomenon in an eight-year old girl. *Srp Arh Celok Lek,* 142**,** 239-42.

GREGORY, C. A., GUNN, W. G., PEISTER, A. & PROCKOP, D. J. 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem,* 329**,** 77-84.

GRUNDNES, O. & REIKERÅS, O. 1992. Closed versus open medullary nailing of femoral fractures. Blood flow and healing studied in rats. *Acta Orthop Scand,* 63**,** 492-6.

INFANTE, A. & RODRÍGUEZ, C. I. 2018. Osteogenesis and aging: lessons from mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther,* 9**,** 244.

J. D. RINGE, M. B., M. DÖREN, K. J. MÜNZENBERG, CH. REINERS, H. P. G. SCHNEIDER, A. SCHULZ 2019. *Osteoporose: Pathogenese, Diagnostik und Therapiemöglichkeiten*, De Gruyter.

KAKU, M., IZUMINO, J., YAMAMOTO, T., YASHIMA, Y., SHIMOE, S. & TANIMOTO, K. 2022. Functional regulation of osteoblastic MC3T3E-1 cells by hyperbaric oxygen treatment. *Arch Oral Biol,* 138**,** 105410.

KANIS, J. A. 2002. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet,* 359**,** 1929-36.

KAUL, S., ROTHNEY, M. P., PETERS, D. M., WACKER, W. K., DAVIS, C. E., SHAPIRO, M. D. & ERGUN, D. L. 2012. Dual-energy X-ray absorptiometry for quantification of visceral fat. *Obesity (Silver Spring),* 20**,** 1313-8.

KHAN, A. A., MORRISON, A., HANLEY, D.A., FELSENBERG, D., MCCAULEY, L.K., O'RYAN, F., REID, I.R., RUGGIERO, S.L., TAGUCHI, A., TETRADIS, S., WATTS, N.B., BRANDI, M.L., PETERS, E., GUISE, T., EASTELL, R., CHEUNG, A.M., MORIN, S.N., MASRI, B., COOPER, C., MORGAN, S.L., OBERMAYER-PIETSCH, B., LANGDAHL, B.L., AL DABAGH, R., DAVISON, K.S., KENDLER,

D.L., SÁNDOR, G.K., JOSSE, R.G., BHANDARI, M., EL RABBANY, M., PIERROZ, D.D., SULIMANI, R., SAUNDERS, D.P., BROWN, J.P., COMPSTON, J. 2015. Diagnosis and Management of Osteonecrosis of the Jaw: A Systematic Review and International Consensus. j bone miner res.

KIRBY, J. P., SNYDER, J., SCHUERER, D. J. E., PETERS, J. S. & BOCHICCHIO, G. V. 2019. Essentials of Hyperbaric Oxygen Therapy: 2019 Review. *Mo Med,* 116**,** 176-179.

LEBOFF, M. S., NARWEKER, R., LACROIX, A., WU, L., JACKSON, R., LEE, J., BAUER, D. C., CAULEY, J., KOOPERBERG, C., LEWIS, C., THOMAS, A. M. & CUMMINGS, S. 2009. Homocysteine levels and risk of hip fracture in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab,* 94**,** 1207-13.

LI, X., QIN, L., BERGENSTOCK, M., BEVELOCK, L. M., NOVACK, D. V. & PARTRIDGE, N. C. 2007. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem,* 282**,** 33098-106.

LIGUORI, I., RUSSO, G., CURCIO, F., BULLI, G., ARAN, L., DELLA-MORTE, D., GARGIULO, G., TESTA, G., CACCIATORE, F., BONADUCE, D. & ABETE, P. 2018. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging,* 13**,** 757-772.

LIN, S. S., UENG, S. W., NIU, C. C., YUAN, L. J., YANG, C. Y., CHEN, W. J., LEE, M. S. & CHEN, J. K. 2014. Effects of hyperbaric oxygen on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord,* 15**,** 56.

LOKE, Y. K., JEEVANANTHAM, V. & SINGH, S. 2009. Bisphosphonates and atrial fibrillation: systematic review and meta-analysis. *Drug Saf,* 32**,** 219-28.

LONGO, U. G., LOPPINI, M., DENARO, L., MAFFULLI, N. & DENARO, V. 2012. Conservative management of patients with an osteoporotic vertebral fracture: a review of the literature. *J Bone Joint Surg Br,* 94**,** 152-7.

LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2019. Zellenlehre. *In:* LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. (eds.) *Taschenlehrbuch Histologie.* 6., vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

MARRA, M., SAMMARCO, R., DE LORENZO, A., IELLAMO, F., SIERVO, M., PIETROBELLI, A., DONINI, L. M., SANTARPIA, L., CATALDI, M., PASANISI, F. & CONTALDO, F. 2019. Assessment of Body Composition in Health and Disease Using Bioelectrical Impedance Analysis (BIA) and Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DXA): A Critical Overview. *Contrast media & molecular imaging,* 2019**,** 3548284-3548284.

MCGIRT, M. J., PARKER, S. L., WOLINSKY, J. P., WITHAM, T. F., BYDON, A. & GOKASLAN, Z. L. 2009. Vertebroplasty and kyphoplasty for the treatment of vertebral compression fractures: an evidenced-based review of the literature. *Spine J,* 9**,** 501-8.

MCLEAN, R. R., JACQUES, P. F., SELHUB, J., TUCKER, K. L., SAMELSON, E. J., BROE, K. E., HANNAN, M. T., CUPPLES, L. A. & KIEL, D. P. 2004. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med,* 350**,** 2042-9.

MONFOULET, L. E., BECQUART, P., MARCHAT, D., VANDAMME, K., BOURGUIGNON, M., PACARD, E., VIATEAU, V., PETITE, H. & LOGEART-AVRAMOGLOU, D. 2014. The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part A,* 20**,** 1827-40.

NEWMAN, M., MINNS LOWE, C. & BARKER, K. 2016. Spinal Orthoses for Vertebral Osteoporosis and Osteoporotic Vertebral Fracture: A Systematic Review. *Arch Phys Med Rehabil,* 97**,** 1013-25.

OKUBO, Y., BESSHO, K., FUJIMURA, K., KUSUMOTO, K., OGAWA, Y. & IIZUKA, T. 2001. Effect of hyperbaric oxygenation on bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Br J Oral Maxillofac Surg,* 39**,** 91-5.

OZGOCMEN, S., KAYA, H., FADILLIOGLU, E., AYDOGAN, R. & YILMAZ, Z. 2007a. Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Mol Cell Biochem,* 295**,** 45-52.

OZGOCMEN, S., KAYA, H., FADILLIOGLU, E. & YILMAZ, Z. 2007b. Effects of calcitonin, risedronate, and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Arch Med Res,* 38**,** 196-205.

PADERNO, E., ZANON, V., VEZZANI, G., GIACON, T. A., BERNASEK, T. L., CAMPORESI, E. M. & BOSCO, G. 2021. Evidence-Supported HBO Therapy in Femoral Head Necrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health,* 18.

PAPAPETROU, P. D. 2009. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones (Athens),* 8**,** 96-110.

PFEIFER, M., BEGEROW, B. & MINNE, H. W. 2004a. Effects of a new spinal orthosis on posture, trunk strength, and quality of life in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized trial. *Am J Phys Med Rehabil,* 83**,** 177-86.

PFEIFER, M., SINAKI, M., GEUSENS, P., BOONEN, S., PREISINGER, E. & MINNE, H. W. 2004b. Musculoskeletal rehabilitation in osteoporosis: a review. *J Bone Miner Res,* 19**,** 1208-14.

PRIETO-ALHAMBRA, D., JAVAID, M. K., JUDGE, A., MURRAY, D., CARR, A., COOPER, C. & ARDEN, N. K. 2011. Association between bisphosphonate use and implant survival after primary total arthroplasty of the knee or hip: population based retrospective cohort study. *Bmj,* 343**,** d7222.

QUANDT, S. A., THOMPSON, D. E., SCHNEIDER, D. L., NEVITT, M. C. & BLACK, D. M. 2005. Effect of alendronate on vertebral fracture risk in women with bone mineral density T scores of-1.6 to -2.5 at the femoral neck: the Fracture Intervention Trial. *Mayo Clin Proc,* 80**,** 343-9.

REINER BARTL, C. B. 2021. *Das Osteoporose Manual*, Springer, Berlin, Heidelberg.

SAHLENDER, B., WINDOLF, J. & SUSCHEK, C. V. 2022. Superoxide dismutase and catalase significantly improve the osteogenic differentiation potential of osteogenetically compromised human adipose tissue-derived stromal cells in vitro. *Stem Cell Res,* 60**,** 102708.

SALAMEH, M., MOGHAMIS, I. S., KOKASH, O. & AHMED, G. O. 2021. Hyperbaric oxygen therapy for the treatment of Steinberg I and II avascular necrosis of the femoral head: a report of fifteen cases and literature review. *Int Orthop,* 45**,** 2519-2523.

SAWAI, T., NIIMI, A., TAKAHASHI, H. & UEDA, M. 1996. Histologic study of the effect of hyperbaric oxygen therapy on autogenous free bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg,* 54**,** 975-81.

SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LÜTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. & BOYLE, W. J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell,* 89**,** 309-19.

SIRIS, E. S., SIMON, J. A., BARTON, I. P., MCCLUNG, M. R. & GRAUER, A. 2008. Effects of risedronate on fracture risk in postmenopausal women with osteopenia. *Osteoporos Int,* 19**,** 681-6.

SMOLLE, C., LINDENMANN, J., KAMOLZ, L. & SMOLLE-JUETTNER, F. M. 2021. The History and Development of Hyperbaric Oxygenation (HBO) in Thermal Burn Injury. *Medicina (Kaunas),* 57.

TSAI, J. N., UIHLEIN, A. V., LEE, H., KUMBHANI, R., SIWILA-SACKMAN, E., MCKAY, E. A., BURNETT-BOWIE, S. A., NEER, R. M. & LEDER, B. Z. 2013. Teriparatide and denosumab, alone or combined, in women with postmenopausal osteoporosis: the DATA study randomised trial. *Lancet,* 382**,** 50-6.

TUNCAY, O. C., HO, D. & BARKER, M. K. 1994. Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop,* 105**,** 457-63.

ULFIG, N. 2019a. Das Knochengewebe. *In:* ULFIG, N. (ed.) *Kurzlehrbuch Histologie.* 5., unveränderte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag.

ULFIG, N. 2019b. *Kurzlehrbuch Histologie,* Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.

VAN MEURS, J. B., DHONUKSHE-RUTTEN, R. A., PLUIJM, S. M., VAN DER KLIFT, M., DE JONGE, R., LINDEMANS, J., DE GROOT, L. C., HOFMAN, A., WITTEMAN, J. C., VAN LEEUWEN, J. P., BRETELER, M. M., LIPS, P., POLS, H. A. & UITTERLINDEN, A. G. 2004. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med,* 350**,** 2033-41.

VENMANS, A., KLAZEN, C. A., LOHLE, P. N., VAN ROOIJ, W. J., VERHAAR, H. J., DE VRIES, J. & MALI, W. P. 2010. Percutaneous vertebroplasty and pulmonary cement embolism: results from VERTOS II. *AJNR Am J Neuroradiol,* 31**,** 1451-3.

VESTERGAARD, P., REJNMARK, L. & MOSEKILDE, L. 2011. Are antiresorptive drugs effective against fractures in patients with diabetes? *Calcif Tissue Int,* 88**,** 209-14.

VEZZANI, G., QUARTESAN, S., CANCELLARA, P., CAMPORESI, E., MANGAR, D., BERNASEK, T., DALVI, P., YANG, Z., PAOLI, A., RIZZATO, A. & BOSCO, G. 2017. Hyperbaric oxygen therapy modulates serum OPG/RANKL in femoral head necrosis patients. *J Enzyme Inhib Med Chem,* 32**,** 707-711.

WARREN, S. M., STEINBRECH, D. S., MEHRARA, B. J., SAADEH, P. B., GREENWALD, J. A., SPECTOR, J. A., BOULETREAU, P. J. & LONGAKER, M. T. 2001. Hypoxia regulates osteoblast gene expression. *J Surg Res,* 99**,** 147-55.

WATTS, N. B., JOSSE, R. G., HAMDY, R. C., HUGHES, R. A., MANHART, M. D., BARTON, I., CALLIGEROS, D. & FELSENBERG, D. 2003. Risedronate prevents new vertebral fractures in postmenopausal women at high risk. *J Clin Endocrinol Metab,* 88**,** 542-9.

WEIR, E. & CULMER, L. 2004. Fall prevention in the elderly population. *Cmaj,* 171**,** 724.

WEYDERT, C. J. & CULLEN, J. J. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc,* 5**,** 51-66.

WINKLMAYR, M., KLUGE, C., WINKLMAYR, W., KÜCHENHOFF, H., STEINER, M., RITTER, M. & HARTL, A. 2015. Radon balneotherapy and physical activity for osteoporosis prevention: a randomized, placebo-controlled intervention study. *Radiat Environ Biophys,* 54**,** 123-136.

WU, D., MALDA, J., CRAWFORD, R. & XIAO, Y. 2007a. Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone. *Connect Tissue Res,* 48**,** 206-13.

WU, D., MALDA, J., CRAWFORD, R. & XIAO, Y. 2007b. Effects of Hyperbaric Oxygen on Proliferation and Differentiation of Osteoblasts from Human Alveolar Bone. *Connective Tissue Research,* 48**,** 206-213.

ZAMBITO, A., BIANCHINI, D., GATTI, D., ROSSINI, M., ADAMI, S. & VIAPIANA, O. 2007. Interferential and horizontal therapies in chronic low back pain due to multiple

vertebral fractures: a randomized, double blind, clinical study. *Osteoporos Int,* 18**,** 1541-5.

ZHOU, Q., ZHU, L., ZHANG, D., LI, N., LI, Q., DAI, P., MAO, Y., LI, X., MA, J. & HUANG, S. 2016. Oxidative Stress-Related Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analyses. *Dis Markers,* 2016**,** 7067984.

**Links:**

**Osteon Mineralisation**
https://www.medizin-kompakt.de/osteon (aufgerufen am 03.03.2022) Seite 3

**Osteoporose**
https://www.netdoktor.de/krankheiten/osteoporose/ (aufgerufen am 03.04.2022) Seite 8

**S3-Leitlinie Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose**
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/183-001l_S3_Osteoporose-Prophylaxe-Diagnostik-Therapie_2019-02.pdf ) (aufgerufen am 25.02.24) Seite 11

**Boyle-Mariotte-Gesetz**
https://www.leifiphysik.de/waermelehre/allgemeines-gasgesetz/grundwissen/gesetz-von-boyle-und-mariotte ( aufgerufen am 22.02.2024) Seite 14

**HBO**
https://www.gtuem.org/hbo-therapie/sh-25.html, aufgerufen am 25.02.2024; Seite 15

## 7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim Windolf für die Möglichkeit, die Experimente für die Dissertation im Rahmen des Forschungslabors der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie Düsseldorf ausführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Johannes Schneppendahl danke ich für die thematische Basis, Besprechungen der Experimente, die wissenschaftliche Betreuung, freundliche Hilfe und wertvolle Ratschläge.

Ich danke Frau Dr. Oezel für die wirklich großartige Aufnahme und Betreuung als Doktormutter, nachdem Prof. Dr. Schneppendahl als Chefarzt nach Mülheim ging. Durch ihre konstruktiven Kritikvorschläge und ihre kompetente, zuverlässige Unterstützung hat sie einen großen Teil zur Promotion beigetragen. Ich danke ihr für ein offenes Ohr und Verbesserungsvorschläge.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Vera Grotheer für eine sehr kompetente, ausdauernde, zuverlässige, freundliche Unterstützung sowohl im Labor bei Ausführung der Experimente als auch in den Jahren danach bei der Erstellung dieser Arbeit. Sie hat die Arbeit und mich mit ihrer gesamten Expertise, ihrem Tatendrang und ihrer Leidenschaft für die Wissenschaft immer wieder ein großes Stück nach vorne gebracht.

Ein großer Dank geht an die Technischen Assistentinnen Jutta, Samira, Christa und Sabine für die umfassende Einarbeitung in sämtliche Labormaterialien und Geräte. Auch mit geringen Vorkenntnissen konnte ich durch ihre Hilfe diese Arbeit mit signifikanten Ergebnissen abschließen. Zusammen mit vielen netten Mitstudenten im Labor wurde die Zeit für mich in einer gegenseitig unterstützenden Arbeitsatmosphäre unvergesslich geprägt.

Von Herzen dankbar bin ich für jede Unterstützung durch meine Familie und Freunde während dieser Zeit und der Zeit meines Studiums. Ich möchte meinem Freund Michél, meinen Eltern Martina und Peter Flender, meiner Schwester Ina und meinem Schwager Thomas danken, die an mich geglaubt und zu jeder Zeit motivierende Worte gefunden haben. Zudem möchte ich meiner Freundin Rebecca danken, die voller Tatendrang die letzten Schritte der Promotion mit mir gegangen ist.

DANKSAGUNG

Zu tiefster Dankbarkeit bin ich meiner Oma Auguste verpflichtet, die mich mit ihrem hohen Alter durch ihre Erfahrung emotional unterstützen konnte. Seit Tag 1 meines Medizinstudiums hat sie immer an mich geglaubt und dutzende Kerzen für jede einzelne Prüfung entzündet.