Tissue Engineering von Knochen- und Knorpelgewebe:

Die Bedeutung von Sauerstoff und Hypoxie

Florian-Dominique Naal¹, Erwin Steinhäuser¹, Johannes Schauwecker¹, Peter Diehl¹, Wolfram Mittelmeier²

Schlagnworte:

Sauerstoff – Hypoxie – Osteoblasten – Tissue Engineering – Chondrozyten

Der Einsatz poröser Scaffolds im Tissue Engineering ermöglicht die de novo Synthese dreidimensionaler Gewebekonstrukte. Ein limitierender Faktor ist hierbei die im Inneren des Scaffolds geringe Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen. Aus diesem Grund liegt die Dicke generierter Gewebestücke bei Knochen meist nicht über 500 µm. Bei der Generierung von Knorpel werden Durchmesser von ca. 1 mm erreicht. Durch eine Steigerung des Sauerstoffpartialdruckes, etwa durch hyperbare Oxygenierung (HBO), könnte diese Situation verbessert werden. Hyper- und Hypoxie spielen weiterhin auch eine wichtige regulatorische Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Syntheseleistung von Zellen. In der vorliegenden Arbeit wird ein Überblick über die Auswirkungen von Sauerstoff, Hypoxie und HBO auf Osteoblasten und Chondrozyten gegeben, welcher Rückschlüsse für ein erfolgreiches Tissue Engineering von Knochen- und Knorpelgewebe ermöglichen soll.

Einleitung

Tissue Engineering ist eine zukunftsweisende Technik mit der Möglichkeit, Gewebe de novo zu synthetisieren. Um dreidimensionale Gewebekonstrukte zu erhalten, werden Zellen auf poröse Matrices – so genannte Scaffolds ausgesät – die als künstliche Extrazellulärmatrix dienen. Auf diesen Leitschienen erfolgen Proliferation, Migration in das Innere des Gerüsts, Differenzierung und Synthese zellspezifischer Komponenten, wodurch schließlich das de novo Gewebe entsteht. Ein wichtiger limitierender Faktor ist hierbei die im Inneren des Scaffolds geringe Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen. Aus diesem Grund liegt die Dicke generierter Gewebestücke bei Knochen meist nicht über 500 µm [7]. Die Zellkolonisation in der Scaffold-Peripherie verursacht zusätzlich einen O₂- und Nährstoffverbrauch und bildet zugleich eine Diffusionsbarriere. Insbesondere bei der Generierung von Knochengewebe reduziert die beginnende Mineralisation in der Peripherie das Nährstoffangebot im Gerüstzentrum weiter.

Im Gegensatz hierzu können durch herkömmliche Scaffolds Knorpelkonstrukte generiert werden, die dicker als 1 mm sind. Als ursächlich für diese Tatsache kann der niedrige Sauerstoffbedarf von Knorpelzellen angenommen werden [7].

Die geringe O₂-Verfügbarkeit im Leitschienen-Zentrum kann möglicherweise verbessert werden, in dem das Sauerstoffangebot während der Kultivierung erhöht wird, z. B. durch eine Inkubation in hyperbarem Sauerstoff. Sauerstoff hat neben seiner nutritiven Funktion allerdings auch eine wichtige zellregulatorische Bedeutung. So können Hyperoxie und Hypoxie die Proliferation, Differenzierung und Syntheseleistung von Zellen entscheidend beeinflussen. Die vor-

liegende Arbeit soll einen literaturbasierten Überblick über die Auswirkungen von Sauerstoff, Hypoxie und HBO auf Osteoblasten sowie Chondrozyten geben und Rückschlüsse für ein erfolgreiches Tissue Engineering von Knochen- und Knorpelgewebe ermöglichen.

Hyperbarer Sauerstoff (HBO)

Hyperbare Oxygenierung (HBO) bedeutet die Applikation von 100% O₂ bei Drücken oberhalb von 1 bar. Hierdurch wird der Anteil physikalisch gelösten Sauerstoffs in flüssigen Medien wie Blut oder Nährmedium erhöht. In der klinischen Anwendung atmen Patienten in speziellen Druckkammern intermittierend reinen Sauerstoff ein, meist bei einem Druck von 2–2,5 bar für 90–120 min. [29]. Die klinische Anwendung erfolgt bei verschiedenen Krankheitsbildern wie CO-Intoxikation, nekrotisierenden Weichteilinfektionen, Gasgangrän, Osteomyelitis, Kompartmentsyndrom, Radionekrosen, Verbrennungen und vor allem bei Wundheilungsstörungen [11, 15, 29]. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei neben der verbesserten Gewebeerxygenation die Induktion und Förderung von Angiogenese und Neovaskularisation durch HBO [17, 29]. Die immunmodulatorischen Auswirkungen von HBO werden in der Literatur mit kontroversen Ergebnissen im Sinne einer sowohl immunstimulatorischen als auch immunsuppressiven Wirkung beschrieben [31].

Ein limitierender Faktor bei der in vitro Anwendung von HBO ist die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen wie H₂O₂, O₂⁻ und O_H⁻ [24]. Diese Radikale besitzen auf Grund direkter Interaktion mit intrazellulären Proteinen ein zytotoxisches und proapoptotisches Potential, insbesondere bei Zellen, die über wenige Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress verfügen, wie es bei Chondrozyten der Fall ist [5, 24].

¹ Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München

² Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Universität Rostock

Auswirkungen von Sauerstoff, HBO und Hypoxie auf Osteoblasten

Die meisten Arbeiten im Zusammenhang von Knochengewebe und O_2 -Angebot behandeln das Gebiet der Frakturheilung. So wurde gezeigt, dass es infolge sekundärer Gefäßverletzungen im Rahmen eines Frakturgeschehens zur Hypoxie kommt, wodurch zahlreiche molekulare Vorgänge initiiert werden, die zur Frakturheilung führen [25, 30]. Auf der anderen Seite ist ein ausreichendes O_2 -Angebot Grundbedingung für die Formierung neuen Knochens [1].

In vitro Untersuchungen haben verschiedene, teils konträre Ergebnisse für das Verhalten von Osteoblasten unter Hypo- und Hyperoxie gezeigt. Tuncay et al. [27] inkubierten Osteoblasten bei 90% O_2 und unter hypoxischen Bedingungen (10% O_2). Hypoxie führte dabei zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen, während Kollagen-Synthese und Aktivität der Alkalischen Phosphatase (beides wichtige Marker für die Zelldifferenzierung) abnahmen. Eine Hyperoxygenierung ergab dagegen eine verminderte Proliferation und gesteigerte Differenzierung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Matsuda et al. [16]. Sie kultivierten humane Osteoblasten bei 5% O_2 , wodurch die Zellproliferation gesteigert und die Alkalische Phosphatase-Aktivität inhibiert wurden. Auch Brighton et al. [3] schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die Proliferation von Osteoblasten unter hypoxischen Bedingungen gesteigert wird, wohingegen für die makromolekulare Synthese höhere Sauerstoffkonzentrationen benötigt werden. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen fand Kubota [13] eine Proliferationshemmung bei Osteoblasten, die bei 10% O_2 kultiviert wurden. Die aufgezeigte Hemmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität wurde hingegen bestätigt. Steinbrech et al. [25] zeigten eine Proliferationshemmung und Synthesesteigerung von Osteoblasten unter Hypoxie. Einheitlich wurde die gesteigerte Synthese von VEGF (vessel endothelial growth factor) unter niedrigen Sauerstoffkonzentrationen beobachtet [2, 25]. VEGF ist ein potenter angiogener Faktor, der auch unter Einwirkung von Zytokinen wie IGF-I (insulin-like growth factor) und TGF β (tumor growth factor) gebildet wird [2]. Diese Zytokine werden von Osteoblasten unter Hypoxie vermehrt gebildet, wodurch neben der Bildung von VEGF vor allem die Proliferation und Reifung von Osteoblasten gefördert werden [26, 30]. Warren et al. [30] zeigten einen Anstieg der Synthese von Kollagen I und III in Osteoblasten, abhängig von der Dauer der Hypoxie. Kollagen I ist Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix im Knochengewebe.

Der Einsatz von hyperbarem Sauerstoff führt zu einer beschleunigten Frakturheilung, Knochenwachstum und Mineralisation [4, 28]. Levin et al. [14] behandelten Ratten mit induzierter Femurkopfnekrose täglich für 90 min. mit HBO bei 2,5 bar. Sie fanden eine evident beschleunigte Osteogenese und Resorption nekrotischen Knochens. Neben der Zunahme neu formierten Knochens konnte auch eine gesteigerte Angiogenese nachgewiesen werden. Obwohl Hypoxie im Bezug auf die Frakturheilung regulatorische und stimulatorische Funktionen besitzt, scheint eine Hyperoxygenierung die Frakturheilung durch vermehrtes Wachstum und gesteigerte Syntheseleistung von Osteoblasten zu beschleunigen. Im Rahmen der Frakturheilung spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle. Beim Tissue Engineering zeigt sich hingegen das Problem, dass das generierte Knochengewebe keine eigene Gefäßversorgung aufweist und so die Versorgung mit Nährstoffen und O_2 erschwert ist. Frerich et al. [8] besiedelten Mikrocarrier mit knöchernen Stroma- und umbilikalen Endothelzellen und kultivierten sie unter Zusatz von VEGF in einer Rotations-

kammer. Ziel war es, kapillar-ähnliche Strukturen innerhalb eines knöchernen Gerüsts zu erhalten. Dabei zeigten sie, dass durch tägliche Inkubation mit hyperbarem Sauerstoff (30 min., 10^5 Pa Überdruck) eine signifikante Längenzunahme kapillar-ähnlicher Strukturen zu erreichen war.

Das Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) ist bekannt für seine guten osteoinduktiven Eigenschaften. Durch zusätzliche Anwendung von HBO können die Eigenschaften des BMP-2 verstärkt und Proliferation bzw. Syntheseleistung von Osteoblasten gesteigert werden [22].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Proliferation von Osteoblasten unter hypoxischen Kulturbedingungen gefördert wird. Die positive Wirkung von in vitro zugeführtem BMP-2 könnte durch eine zusätzliche intermittierende hyperbare Oxygenierung verstärkt werden. Weiterhin wird durch kurzfristige HBO-Behandlung das Sauerstoffangebot im Scaffold-Inneren verbessert. Die Verknüpfung von BMP-2 transfizierten Osteoblasten mit einer intermittierenden hyperbaren Sauerstoffinkubation könnte eine geeignete Kombination für das Tissue Engineering von Knochen sein, um einerseits die Proliferation und Knochenbildung in vitro zu steigern und andererseits die osteogenen Eigenschaften des BMP-2 nach einer in vivo Transplantation temporär zu erhalten.

Auswirkungen von Sauerstoff, HBO und Hypoxie auf Chondrozyten

In vivo sind Chondrozyten an geringe Sauerstoffpartialdrücke adaptiert. Physiologischerweise liegt die O_2 -Konzentration an der äußeren Knorpelschicht bei etwa 10% und erreicht in der tiefsten Schicht lediglich 1% [9]. Auf Grund fehlender Kapillarisation wird Knorpelgewebe durch von der Synovia ausgehende Diffusion ernährt. Bereits in der Synovia ist der O_2 -Partialdruck mit ca. 50 mmHg niedrig im Vergleich zu ca. 90 mmHg in vaskularisierten Geweben. Dementsprechend finden sich in der Literatur hauptsächlich Ergebnisse, die für Chondrozyten eine Steigerung von Proliferation und molekularer Syntheseleistung unter hypoxischen Kulturbedingungen aufzeigen. Dennoch ist ein basales Angebot an Sauerstoff für eine intakte Zellfunktion unbedingt notwendig. Grimshaw et al. [9] kultivierten Chondrozyten bei <0,1, 1, 5, 10 und 20% Sauerstoff. Sie zeigten, dass die höchste Matrixsynthese bei 10% O_2 erfolgte, bei nahezu anoxischen Bedingungen (<0,1% O_2) war die Zellfunktion schwer gestört. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Kellner et al. [12]. Sie zeigten, dass künstlich generierte Knorpelkonstrukte im Zentrum nahezu anoxische Verhältnisse aufwiesen. Eine histologische Gewebekonstruktion war allerdings bei O_2 -Partialdrücken unterhalb von 11 mmHg im Konstruktzentrum nicht möglich. O'Driscoll et al. [21] fanden eine Inhibition von Knorpelbildung und Kollagen Typ-II-Synthese bei hyperoxischen und stark hypoxischen Bedingungen (90% bzw. 1-5%). Die maximale Chondrogenese wird bei O_2 -Konzentrationen im Bereich von 12-15% beschrieben. Interessanterweise führten Untersuchungen von Obradovic et al. [20] zu dem Ergebnis, dass sich durch eine verstärkte Oxygenierung in 3-D Konstrukten größere Knorpelvolumina generieren lassen. Auch Murphy et al. [19] beschrieben eine gesteigerte makromolekulare Syntheseleistung von Chondrozyten bei 20% O_2 , verglichen mit 5% und insbesondere 1% O_2 .

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Kultivierung von Chondrozyten ist der Verlust ihres Phänotyps bzw. die Dedifferenzierung der Zellen [18]. Durch in vitro Anzucht wird zwar die Zellzahl gesteigert, was für ein

erfolgreiches Tissue Engineering unabdingbar ist, dennoch muss anschließend eine Redifferenzierung der Zellen erreicht werden, um keine minderwertigen Knorpelkonstrukte zu erhalten. Verschiedene Untersuchungen haben diesbezüglich eine positive Wirkung von dreidimensionalen Alginat-Kulturen (Alginat ist ein lineares Copolymer aus β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure und wird aus Braunalgen gewonnen) gezeigt, insbesondere in Kombination mit einer niedrigen Sauerstoffkonzentration. Domm et al. [6] konnten eine gesteigerte proliferative Aktivität und verstärkte Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile durch Alginat-Kultivierung bei 5% O_2 sowie die Redifferenzierung dedifferenzierter Chondrozyten aufzeigen. Ebenso erzielten Murphy et al. [18] eine Redifferenzierung bei 5% O_2 in Alginat-Kultur, verbunden mit einer Zunahme der Kollagen Typ-II- und Aggrecan-Synthese. Die Kollagen Typ-I-Expression, ein wichtiger Dedifferenzierungsmarker, war hingegen deutlich vermindert. Auch die Kombination von Hypoxie (5%) und intermittierendem hydrostatischen Hochdruck (0,2 MPa) führte zu einer gesteigerten Proliferation von kultivierten Chondrozyten, einer vermehrten makromolekularen Synthese und einer phänotypischen Stabilisierung der Zellen [10]. Der Einsatz von hyperbarem Sauerstoff im Tissue Engineering von Knorpelgewebe muss differenziert beurteilt werden. Ein gesteigerter Sauerstoffpartialdruck könnte die limitierende O_2 -Versorgung in Konstrukten, insbesondere im Zentrum der Leitschienen verbessern. Im Inneren derartiger Konstrukte herrschen nahezu anoxische Bedingungen, die kompromittierend wirken [12]. Diese Situation könnte durch eine HBO-Inkubation deutlich verbessert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Chondrozyten unter hypoxischen Bedingungen, wie sie auch in vivo anzutreffen sind, am besten kultivieren lassen. Daher stellen Kulturbedingungen bei Raumluft (21% O_2) eine für Chondrozyten unphysiologische Umgebung dar. Eine intermittierende in vitro-Anwendung von HBO bei sonst hypoxischen Kulturbedingungen könnte allerdings Vorteile im Tissue Engineering größerer Knorpelkonstrukte bringen. Dies muss jedoch zunächst in experimentellen Arbeiten untersucht werden, unter Berücksichtigung der infolge hyperbarer Oxygenation ansteigenden Bildung freier Sauerstoffradikale. Chondrozyten exprimieren im Vergleich zu anderen Zellen eine geringere Menge an zellprotektiven Enzymen [5]. Eine durch Sauerstoffradikale reduzierte Kollagen Typ-II-Synthese und verminderte Proliferation von Chondrozyten konnte belegt werden [23].

Abstract

The use of porous scaffolds in Tissue Engineering results in the possibility to create 3-D constructs. A limiting factor is the relatively low oxygen and nutrient supply in the center of the scaffolds. This leads to only small constructs of about 500 μ m thickness. Engineered cartilage reaches diameters about 1 mm. Elevated pO_2 , for example induced by hyperbaric oxygen (HBO), could improve this situation. Nevertheless, hyper- and hypoxia play also an important role in cells, regulating proliferation, differentiation and macromolecular synthesis. The present work gives an overview about the role of oxygen, hypoxia and HBO in osteoblasts and chondrocytes and should allow conclusions for an improved Engineering of bone and cartilage tissues.

Literatur

[1] Aitasalo K., Niinikoski J., Grenman R., Virolainen E.: A modified protocol for early treatment of osteomyelitis and osteoradionecrosis of the mandible. *Head Neck* 20, 1998, 411-17

Florian-Dominique Naal

über
Dr. med. Peter Diehl, Klinik
für Orthopädie und Sport-
orthopädie, Technische
Universität München,
Ismaninger Str. 22,
D-81675 München.
Tel: (089) 4140-5289,
Fax: (089) 4140-7242,
E-mail: P. Diehl@LRZ.tum.de

Akademischer Lebenslauf:

1998–2002	Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
August 2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001–2002	Fernstudium der Gesundheitsökonomie am betriebswirtschaftlichen Institut Dr. Braunschweig, Köln
Seit 2002	Studium der Humanmedizin an der TU München

[2] Akeno N., Czyzyk-Krzeska M. F., Gross T. S., Clemens T. L.: Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2alpha. *Endocrinology* 142, 2001, 959-62

[3] Brighton C. T., Schaffer J. L., Shapiro D. B., Tang J. J., Clark C. C.: Proliferation and macromolecular synthesis by rat calvarial bone cells grown in various oxygen tensions. *J Orthop Res* 9, 1991, 847-54

[4] Davis T. R. C., Holloway I. T., Pooley J.: Effect of exposure air elevated oxygen levels on bone blood flow in the rabbit. *Undersea Biomed Res* 17, 1990, 201-11

[5] Deahl S. T.: 2 d, Oberley LW, Oberley TD, Elwell JH. Immunohistochemical identification of superoxide dismutases, catalase, and glutathione-S-transferases in rat femora. *J Bone Miner Res* 7, 1992, 187-98

[6] Domm C., Schunke M., Christesen K., Kurz B.: Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 2002, 13-22

[7] Freed L. E.: Vunjak-Novakovic G. Culture of organized cell communities. *Adv Drug Deliver Rev* 33, 1998, 15-30

[8] Frerich B., Kurtz-Hoffmann J., Lindemann N., Muller S.: Tissue engineering of vascularized bone and soft tissue transplants. *Mund Kiefer Gesichtschir Suppl* 2, 2000, 490-95

[9] Grimshaw M. J., Mason R. M.: Bovine articular chondrocyte function in vitro depends upon oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 2000, 386-92

[10] Hansen U., Schunke M., Domm C., Ioannidis N., Hassenpflug J., Gehrke T., Kurz B.: Combination of reduced

oxygen tension and intermittend hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering. *J Biomech* 34, 2001, 941-49

[11] Jamil M. U., Eckardt A., Franko W.: Hyperbaric oxygen therapy. Clinical use in treatment of osteomyelitis and osteoradionecrosis of the mandible. *Head Neck* 20, 1998, 411-17

[12] Kellner K., Liebsch G., Klimant I., Wolfbeis O. S., Blunk T., Schulz M. B., Gopferich A.: Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 80, 2002, 73-83

[13] Kubota M.: Study on proliferation and function of periodontal ligament fibroblasts and osteoblastic cells under hypoxia. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 56, 1989, 473-84

[14] Levin D., Norman D., Zinman C., Rubinstein L., Sabo E., Misselevich I., Reis D., Boss J. H.: Treatment of experimental avascular necrosis of the femoral head with hyperbaric oxygen in rats: histological evaluation of the femoral heads during the early phase of the reparative process. *Exp Mol Pathol* 67, 1999, 99-108

[15] MacFarlane C., Cronje F. J.: Hyperbaric oxygen and surgery. *S Afr J Surg* 39, 2001, 117-21

[16] Matsuda N., Morita N., Matsuda K., Watanabe M.: Proliferation and differentiation of human osteoblastic cells associated with differential activation of MAP kinases in response to epidermal growth factor, hypoxia, and mechanical stress in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 1998, 350-54

[17] Mechine A., Rohr S., Toti F., Aysoy C., Schneider F., Meyer C., Tempe J. D., Bellocq J. P.: Wound healing and hyperbaric oxygen. Experimental study of the angiogenesis phase in the rat. *Ann Chir* 53, 1999, 307-13

[18] Murphy C. L., Sambanis A.: Effect of oxygen tension and encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng* 7, 2001, 791-803

[19] Murphy C. L., Sambanis A.: Effect of oxygen tension on chondrocyte extracellular matrix accumulation. *Connect Tissue Res* 42, 2001, 87-96

[20] Obradovic B., Carrier R. L., Vunjak-Novakovic G., Freed L. E.: Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* 63, 1999, 197-205

[21] O'Driscoll S. W., Fitzsimmons J. S., Comisso C. N.: Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res* 15, 1997, 682-87

[22] Okubo Y., Bessho K., Fujimura K., Kusumoto K., Suzuki T., Segami N., Ogawa Y., Iizuka T.: Preclinical study of recombinant human bone morphogenetic protein-2: application of hyperbaric oxygenation during bone formation under unfavourable condition. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32, 2003, 113-17

[23] Panasiuk A. F., Iaroshuk G. V., Mitrovich D.: Effect of free radicals on proliferation and metabolism of chon-

drocytes and on sensitivity of a cellular monolayer to proteases. *Vopr Med Khim* 41, 1995, 19-22

[24] Speit G., Dennog C., Radermacher P., Rothfuss A.: Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 512, 2002, 111-19

[25] Steinbrech D. S., Mehara B. J., Saadeh P. B., Chin G., Dudziak M. E., Gerrets R. P., Gittes G. K., Longakar M. T.: Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* 104, 1999, 738-47

[26] Steinbrech D. S., Mehara B. J., Saadeh P. B., Greenwald J. A., Spector J. A., Gittes G. K., Longakar M. T.: Hypoxia increases insulinlike growth factor gene expression in rat osteoblasts. *Ann Plast Surg* 44, 2000: 529-34; discussion 534-35

[27] Tuncay O. C., Ho D., Barker M. K.: Oxygen tension regulates osteoblast function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 105, 1994, 457-63

[28] Ueng S. W., Lee S. S., Lin S. S., Wang C. R., Liu S. J., Yang H. F., Tai C. L., Shih C. H.: Bone healing of tibial lengthening is enhanced by hyperbaric oxygen therapy: a study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *J Trauma* 44, 1998, 676-81

[29] Wang J. J., Li F. F., Calhoun J. H., Mader J. T.: The role and effectiveness of adjunctive hyperbaric oxygen therapy in the management of musculoskeletal disorders. *J Postgrad Med* 48, 2002, 226-31

[30] Warren S. M., Steinbrech D. S., Mehrara B. J., Saadeh P. B., Greenwald J. R., Spector J. A., Bouletreau P. J., Longakar M. T.: Hypoxia regulates osteoblast gene expression. *J Surg Res* 99, 2001, 147-55

[31] Xu X., Yi H., Kato M., Suzuki H., Kobayashi S., Takahashi H., Nakashima I.: Differential sensitivities to hyperbaric oxygen of lymphocyte subpopulations of normal and autoimmune mice. *Immunol Lett* 59, 1997, 79-84