

Tim Hammersen  
Dr. sc. hum.

## **Physicochemical stimuli to enhance the quality of human engineered cartilage: The role of osmolarity and calcium**

Fach/Einrichtung: Orthopädie  
Doktormutter: Prof. Dr. rer. biol. hum. Wiltrud Richter

Aufgrund der geringen Regenerationsfähigkeit von Knorpelgewebe bedarf es regenerativer Ansätze um Knorpeldefekte zu behandeln und so die Funktion des Gewebes im Gelenk wiederherzustellen. Derzeit sind Knorpelersatzgewebe durch eine unzureichende Ablagerung von Typ II Kollagen und Proteoglykan, den Hauptbestandteilen des Gelenkknorpels, limitiert, wodurch das gezüchtete Gewebe den anspruchsvollen mechanischen Bedingungen im Gelenk auf Dauer nicht standhalten kann. In früheren Studien unserer Forschungsgruppe konnte die Knorpelmatrixsynthese mit Hilfe eines definierten mechanischen Belastungsprotokolls akut stimuliert werden, wobei die Induktion entscheidend vom Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalt des Ersatzgewebes und der damit verbundenen Ladungsdichte (engl. fixed charge density, FCD) abhing. Bisher ist jedoch unklar, inwiefern belastungsinduzierte physikalisch-chemische Reize zu den beobachteten Effekten beitragen. Die Identifizierung des entscheidenden physikalisch-chemischen Subparameters der Belastungsantwort, der für die Induktion der Knorpelmatrixsynthese verantwortlich ist, würde es ermöglichen, Knorpelersatzgewebe mit einer einfach anwendbaren Stimulation gezielt zu verbessern. Aufgrund seiner Relevanz für die Funktion des Gelenkknorpels erscheint hyperosmotischer Druck als ein wesentlicher Subparameter der mechanischen Belastungsantwort. Da bisher allerdings unklar ist, inwiefern akuter hyperosmotischer Druck zur Knorpelhomöostase in reifem Knorpelersatzgewebe beiträgt, sind Studien notwendig, die dies unter Berücksichtigung einer knorpeltypischen FCD untersuchen. Interessanterweise wurde in Studien bereits gezeigt, dass eine langfristige hyperosmotische Stimulation den Knorpelmatrixgehalt in nicht-humanen Chondrozyten erhöht. Ob dies auch für humane Chondrozyten in 3D-Kultur der Fall ist wurde bisher jedoch nicht untersucht.

Das Ziel dieser Studie war es daher herauszufinden, ob eine akute hyperosmotische Stimulation, als Subparameter der mechanischen Kompression, die Knorpelmatrixsynthese in humanem Knorpelersatzgewebe bei niedriger und hoher FCD beeinflusst. Parallel dazu wurde getestet, ob eine langfristige hyperosmotische Stimulation die Matrixsynthese und Ablagerung von Knorpelersatzgewebe verbessern kann. Um diese Ziele zu erreichen, wurde humanes Knorpelersatzgewebe für 3 oder 35 Tage vorgeeignet, um eine knorpelähnliche Matrix mit niedrigem oder hohem FCD-Gehalt zu generieren. Die akute hyperosmotische Stimulation von Knorpelersatzgewebe für 3 bis 24 Stunden ergab, dass die bekannten mechanosensitiven Marker, ERK1/2, p38, NFAT5, FOS und FOSB, FCD-unabhängig auch als osmosensitive Marker fungieren. Im Gegensatz zu früheren Belastungsstudien deuteten reduzierte SOX9-Proteinspiegel und eine verringerte BMP-Signalwegaktivität auf eine anti-chondrogene Wirkung der hyperosmotischen Stimulation auf Chondrozyten hin, wobei die Knorpelmatrixsynthese unverändert blieb. Somit konnte gezeigt werden, dass akute hyperosmotische Stimulation zwar einerseits ähnliche Signalwege induzierte wie mechanische Belastung, andererseits jedoch kein entscheidender Parameter für die Stimulation der Knorpelmatrixsynthese war.

Für eine langfristige hyperosmotische Stimulation zur Verbesserung von Knorpelersatzgewebe erscheint extrazelluläres Kalzium aufgrund früherer Studien besonders vielversprechend. Da artikuläre Chondrozyten (AC) und mesenchymale Stromazellen (MSC) häufig verwendete Zelltypen für die Herstellung von Knorpelersatzgeweben sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Reaktion beider Zelltypen auf eine langfristige hyperosmotische Kalzium-Stimulation untersucht. Nach 35-tägiger Kalzium-Behandlung war die Knorpelmatrixbildung in AC-basiertem Knorpelersatzgewebe reduziert, in MSC-

basiertem Knorpelersatzgewebe allerdings erhöht. Die Untersuchung wichtiger pro- und anti-chondrogener Signalwege nach langfristiger Kalziumstimulation zeigte eine spezifische Induktion der katabolen S100A4- und PTHLH-Genexpression in AC. Die Behandlung von AC mit rekombinantem humanem PTHrP1-34-Peptid konnte die kalziumabhängige Reduktion der Knorpelmatrixablagerung teilweise reproduzieren, was auf eine Rolle von PTHrP für die Beeinträchtigung der Knorpelmatrixbildung hindeutete. Bemerkenswert war außerdem, dass die inverse Regulation der Matrixsynthese in AC und MSC-basierten Chondrozyten kalziumspezifisch war und nicht durch allgemeine hyperosmotische Effekte verursacht wurde. Eine langfristige extrazelluläre Kalziumstimulation bietet daher einen vielversprechenden neuen Ansatz um den Knorpelmatrixgehalt in MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe zu verbessern, wohingegen solche Bedingungen während der Knorpelbildung von AC kontraproduktiv sind.

Insgesamt liefert diese Studie wichtige Erkenntnisse, um den Einfluss physikalisch-chemischer Reize auf die Knorpelmatrixbildung zu verstehen. Da nachgewiesen wurde, dass akuter hyperosmotischer Druck kein relevanter Parameter zur akuten Stimulation der Knorpelmatrixsynthese ist, sind nun weitere Studien erforderlich, um den Beitrag anderer belastungsinduzierter Subparameter zur Matrixsynthese zu untersuchen. Des Weiteren deckte diese Studie auf, dass eine langfristige Behandlung mit erhöhtem extrazellulärem Kalziumgehalt einen vielversprechenden neuen Ansatz liefert, um die Qualität von MSC-basiertem Knorpelersatzgewebe durch erhöhte Knorpelmatrixsynthese und -ablagerung zu verbessern. Für die Anwendung im osteochondralen Tissue Engineering würde dies bedeuten, dass MSC in Kombination mit resorbierbaren kalzifizierten Knochenersatzmaterialien die favorisierte Zellquelle für die Herstellung von Knorpelgewebe sein sollten. In weiteren Studien müssen die hier beobachteten Effekte von löslichem extrazellulärem Kalzium nun unter Verwendung resorbierbarer Knochenersatzmaterialien als potenzielle Kalziumquelle bestätigt werden.