

Osteoarthrose *in vitro* – die Rolle von hydrostatischem Druck erzeugten

Sauerstoffradikalen

Osteoarthrose (OA) – die degenerative Erkrankung von Gelenken – ist die am häufigsten auftretende Form von Arthritis und betrifft 25% der erwachsenen Population. OA stellt nicht nur eine enorme Einschränkung der Lebensqualität von betroffenen Patienten, sondern auch eine hohe sozioökonomische Belastung für die Gesellschaft dar. Die genauen Mechanismen, welche OA auslösen oder in ihrem Verlauf vorantreiben, sind bislang jedoch noch weitgehend unbekannt. Unter anderem wurden erhöhte Levels von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) als essentielle OA Auslöser identifiziert, aber auch hier bleibt der Entstehungsmechanismus fraglich. Die zur Erforschung von OA nötigen *in vitro* OA Modelle setzen in den letzten Jahren neben dem alleinigen Einsatz von pro-inflammatorischen Zytokinen vermehrt auf die zusätzliche mechanische Stimulierung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Bioreaktor zu entwickeln, in dem 3D Knorpelzellpellets mittels hydrostatischem Druck mit erhöhten ROS Levels stimuliert werden können, um so ein *in vitro* OA Modell zu etablieren. Dafür wurden primäre, aus humanem Fettgewebe stammende, mesenchymale Stammzellen (adipose derived stem cells, ASC) über einen Zeitraum von 6 Wochen in einem 3D Pelletkultur System zu Chondrozyten differenziert und mit hydrostatischem Druck im Bioreaktor stimuliert. Der Effekt verschiedener Stimulierungsprotokolle auf die Knorpelentwicklung in der 3D Pelletkultur wurde mittels Histologie und Immunhistochemischer Analyse (Färbung von Glykosaminoglykanen (GAG), Kollagen I und II), quantitativer reverser Transkriptions Polymerase Chain Reaction (Expression von knorpelspezifischen Markern wie zB. Aggrecan, Kollagen I und II), Western Blot Analyse (Testung potentiell involvierter Signalwege, i.e. PI3K/Akt und MAPK/ERK) bestimmt. Mit biochemische Analysen wurden GAG und DNA Levels in den Zellpellets bestimmt, die Zellviabilität wurde mittels MTT Assays ermittelt. ROS Levels wurden mit Elektronenspinresonanz Messungen analysiert. Alle statistischen Berechnungen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt (Varianzanalyse und Tukey's/Dunn's Post-hoc-Test), *P*-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant interpretiert.

Die Stimulation im hydrostatischem Druck Bioreaktor führte zu vermehrter ROS Produktion. Der Mechanismus dieser ROS Generierung konnte aufgeklärt werden. Erhöhte ROS Levels im Zellkulturmedium der Knorpelzellpellets führten nicht nur zur Inhibierung der Neubildung von Glykosaminoglykanen und Kollagen II sondern auch zur Reduktion von bereits gebildetem Glykosaminoglykan und Kollagen II. Diese Effekte traten im Zusammenhang mit erhöhter Matrixmetalloproteinase Aktivität und auch gesteigerter Expression inflammatorischer Zytokine auf. Die im Bioreaktor generierten, erhöhten ROS Levels aktivierten PI3K/Akt und

MAPK/ERK Signalwege, welche bereits für ihre Rolle an OA Entstehung und Entwicklung bekannt sind.

Mit dem etablierten Bioreaktorsystem konnte über die Erhöhung von ROS Levels ein *in vitro* Osteoarthrose Model entwickelt werden. Dies erlaubt nun sowohl die weitere Erforschung der Knorpeldegeneration als auch die Anwendung des Systems als vielseitiges Tool zur Testung anti-oxidativer Wirkstoffe.