



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Aged human osteochondral explants as biomimetic osteoarthritis model: towards a druggable target in osteoarthritis

Houtman, E.

Citation

Houtman, E. (2022, October 12). *Aged human osteochondral explants as biomimetic osteoarthritis model: towards a druggable target in osteoarthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3480151>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3480151>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Appendix

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Inleiding

Osteoartrose, beter bekend als artrose, is de meest voorkomende gewrichtsaandoening met ruim 1.5 miljoen gevallen in Nederland. De verwachting is echter dat het aantal patiënten met artrose de komende jaren sterk zal toenemen door de steeds ouder wordende populatie en toename in mensen met overgewicht. Artrose wordt gekenmerkt door pijn en stijfheid van de gewrichten en leidt tot verminderde mobiliteit. Deze symptomen ontstaan doordat er bij artrose afbraak is van de kraakbeenlaag, dat bij gezonde gewrichten voorkomt dat bot over bot gaat schuren. Ook ontstaan er vaak botuitstulpingen aan de randen van de gewrichten (osteofieten). Artrose kan ontstaan in bijna alle gewrichten, maar komt voornamelijk voor in de handen, heupen en knieën. Bij het ontstaan van artrose spelen zowel de erfelijke genetische factoren als omgevingsfactoren een rol. De meest invloedrijke omgevingsfactoren zijn overbelasting, leeftijd en geslacht. In de afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan in grote patiëntengroepen naar de invloed van genetische factoren op het risico om artrose te krijgen. Om vanuit deze veranderingen in de genetica tot een mogelijk aangrijpingspunt voor medicijnen te komen is het essentieel om eerst in het laboratorium op ziekterelevante weefsels experimenten uit te voeren. Ondanks het feit dat er duidelijke artrose risico genen zijn geïdentificeerd, blijft het vervolgonderzoek achterlopen. Een van de redenen daarvoor is dat er geen goede in vitro modellen zijn die het artrose proces in verouderd menselijk weefsel na kunnen bootsen.

Doel van dit proefschrift

Om het onderzoek verder te brengen is een goed menselijk model nodig. In zo'n model moet bijvoorbeeld rekening gehouden worden dat artrose niet een ziekte is van maar één weefsel, maar eerder van het hele gewricht. Daarnaast is het van belang dat medicijnen worden getest op verouderd weefsel omdat uit veel onderzoek naar voren komt dat oudere kraakbeencellen anders/minder reageren op externe stimulatie. Daarom is het van belang voor de patiënt dat medicijnen en/of medische interventies ook getest worden in een model dat zoveel als mogelijk het menselijk verouderde gewricht representeert. Zo'n model kan dienen om de translatie van artrose risico genen naar ontdekking en het testen van nieuwe aangrijpingspunten voor medicijnen te bevorderen.

Het opzetten en onderzoeken van een verouderd humaan kraakbeen-bot model

Artrose wordt veroorzaakt doordat verouderd kraakbeen en zijn cellen niet in staat zijn om goed te reageren op ontstane schade na bv. een overbelasting. In dit proces spelen ook genetische factoren een rol in de capaciteit om te reageren op zulke belastende factoren. Daarnaast is het artrose proces gelinkt aan een verhoogde metabole activiteit van de kraakbeencellen, wat overeenkomt met groeiplaat-kraakbeencellen die endochondrale verbening ondergaan (het proces waarbij bot wordt aangemaakt vanuit de groeiplaat). Tijdens dit proces gaan de kraakbeencellen vermeerderen (delen), worden groter in volume (hypertrofie) en verhogen productie van specifieke markers zoals *ALPL*, *COL10A1* en *MMP13*. Om de tekortkomingen van de vertaling van preklinische diermodellen naar de mens en tegelijkertijd de noodzaak

voor dierproeven te verminderen, zijn er menselijke modellen nodig die de verschillende aspecten van artrose omvatten. Op het moment bestaan de modellen waarop behandelingen worden gebaseerd bijna allemaal uit overbelaste (jonge) diermodellen of uit onderzoek in 2D of 3D cel modellen waarin nieuw kraakbeen wordt aangemaakt door kraakbeencellen of stamcellen. Echter, veel van deze modellen missen de interactie tussen bot en kraakbeen en/of representeren niet het verouderde gewrichtsweefsel dat gevoeliger is voor schade en moeilijker herstelt. Voor zowel het onderzoeken van ziektemechanismes als het testen van medicijnen is het belangrijk om dit in een model te doen die zo dicht mogelijk bij de natuurlijke situatie blijft.

In **hoofdstuk 2** hebben we ervoor gekozen om de response van de kraakbeencel te onderzoeken in verouderde menselijke biopten bestaand uit kraakbeen met daaronder een stukje bot. Het voordeel van dit model is dat de cel in zijn eigen omgeving blijft en de modellen redelijk simpel en makkelijk zijn op te zetten. Vervolgens is onderzocht wat de gevolgen op kraakbeen zijn van drie belastende factoren waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij het artrose proces, zijnde een ontsteking (door middel van IL-1 β), hypertrofie (door middel van schildklierhormoon(T3)) en overbelasting (65% indentatie kraakbeen). Vervolgens is er gekeken naar kraakbeencel signalering (gen expressie), kraakbeenstructuur en -afbraak, en mechanische eigenschappen van kraakbeen. Hierin vonden we dat alle drie de belastende factoren afbraaksignalen stimuleren in verschillende mate. Naast deze overlap waren er ook specifieke reacties per verstoring te onderscheiden. Zo induceerde de ontstekingsfactor een verlaging van kraakbeen aanmaak genen en werd afbraak van kraakbeen matrix gemeten. In tegenstelling, bij de hypertrofie factor werd met name een verhoogde gen expressie van verbenings geassocieerde eiwitten (*ALPL*, *COL10A1*, *COL1A1*) gemeten. Overbelasting gaf een lagere expressie van kraakbeen aanmaak genen en verlaagde de mechanische eigenschappen van het kraakbeen aanzienlijk. In dit hoofdstuk hebben we laten zien dat het mogelijk is om met artrose relevante belastende factoren in verschillende mate afbraak van kraakbeen te induceren. De kracht van ons model is dat het uitgevoerd is in verouderde, macroscopisch normale, menselijke biopten uit een heterogene artrose patiëntenpopulatie. Ondanks deze heterogene populatie laten we zien dat de uitkomsten per verstoring robuust zijn. Onze studie laat zien dat het mogelijk is persoonlijke menselijke artrose modellen op te zetten die de verschillende relevante aspecten van het ziekteproces omvatten. Daarnaast kunnen de opeenvolgende effecten van de verschillende belastende factoren gebruikt worden in de ontwikkeling van nieuwe specifieke behandelingen die de verschillende aspecten van artrose omvatten.

Gevolgen van mechanische belasting op de kraakbeencel gezondheid

Om te weten te komen welke specifieke processen in verouderd menselijk kraakbeen een rol spelen in de afbraak na overbelasting, is in **hoofdstuk 3** een genomwijde genexpressie analyse uitgevoerd. Dit wil zeggen dat de hoeveelheid van alle genen van een monster zijn gemeten en vergeleken tussen mechanische overbelaste en niet-overbelaste samples om te onderzoeken welke genen veranderen na een overbelasting. Hierin vonden we dat 156 genen een afwijkend expressiepatroon hebben na overbelasting. Tussen deze genen kwam een aantal kraakbeen afbraak en bekende artrose geassocieerde genen naar voren (zoals *MMP13*, *TNC*, *WISP2*, *FRZB* etc). Om een beeld te krijgen van wat de functie van deze genen in kraakbeen is, is gekeken naar de overlap in functies van deze genen. Hieruit kwamen de volgende processen

naar voren: insuline-achtige groeifactor bindende eiwitten (IGF-1 productie reguleren; *IGFBP6*, *IGFBP5*, en *IGFBP4*), focale adhesie (betrokken bij overdracht van mechanische krachten; *ITGA10*, *TLN2*, and *CAV1*) en cellulaire senescentie (eiwitten betrokken bij stop van cel deling; *GADD45A*, *MYC*, *SERPINE1*, en *FOXO1*). Van senescentie is al langer bekend dat het proces een rol speelt in veel aandoeningen zoals artrose doordat de cellen als het ware op non-actief staan als gevolg van stress en niet meer reageren op stimulering terwijl ze wel factoren uitscheiden die ongunstig zijn voor de omgeving. Met ons onderzoek hebben wij kennis toegevoegd aan de reactie van kraakbeencellen op een overbelasting. Uit ons onderzoek komen een aantal aanknopingspunten die in de toekomst gebruikt kunnen worden om de onomkeerbare schade na een overbelasting tegen te gaan. Daarnaast laten we zien dat de identificatie van overbelastings-specifieke genen, zoals *MMP13*, kunnen functioneren als een sensitieve marker om zo preventieve bewegingstherapieën op te zetten.

Matrix Gla eiwit (MGP) en risico van lage vitamine K

Zoals eerder genoemd spelen erfelijke factoren een grote rol bij het ontstaan van artrose. Een belangrijk risicogen is het Matrix Gla Eiwit (*MGP*) waarbij het risico variant (rs1800801) voor een lagere gen expressie zorgt in meerdere gewrichtsweefsels, waaronder kraakbeen en bot. *MGP* is een eiwit dat extracellulaire calcium hoeveelheden reguleert door aan ze te binden en zo calcificatie van weefsel voorkomt. Belangrijk is echter dat het eiwit voor zijn functionaliteit afhankelijk is van vitamine K. Bij een verlaging van *MGP* eiwitten is er meer calcificatie van kraakbeen en is er een lagere botdichtheid. Daarnaast zijn te lage vitamine K levels al eerder geassocieerd met het krijgen van artrose.

In **hoofdstuk 4** is in een grotere dataset aangetoond dat het artrose risico variant rs1800801-T associeert met een lagere expressie van *MGP* in zowel kraakbeen als bot. Daarnaast was er een hogere expressie van *MGP* in aangedaan artrose kraakbeen en bot in vergelijking met niet-aangedaan kraakbeen en bot. Deze verhoging van *MGP* komt vooral doordat de expressie meer verhoogd wordt in mensen met het risico variant, maar het expressie level blijft alsnog lager dan die van mensen zonder dit risico variant. Dit suggereert dat mogelijk in reactie op het artrose proces, de kraakbeencellen proberen om calcificatie tegen te gaan en hun productie van *MGP* verhogen. Daarnaast is ook gekeken naar de dynamische verandering van *MGP* expressie tussen dragers en niet-dragers waarna verschillende artrose relevante stimuli gegeven worden. Hier werd gezien dat de expressie van *MGP* omlaag gaat als gevolg van deze stimulatie maar dat dragers van het risico variant nauwelijks reageren. Ten slotte is er nog onderzocht wat de gevolgen zijn voor de ‘gezondheid’ van kraakbeen- en botcellen na toediening van Warfarine, een veel gebruikt vitamine K verlagend medicijn bij mensen met een verhoogd risico op bloedstolsel. Warfarine zorgde voor een ongunstig signaleringsprofiel richting hypertrofie en calcificatie in kraakbeen en verminderde botformatie in onderliggend bot. Ons onderzoek laat zien dat het rs1800801-T variant het risico op artrose verhoogd doordat het de expressie van *MGP* verlaagd. Hierdoor kan in mensen met dit variant het *MGP* eiwit niet zo efficiënt verhoogd worden wanneer dit nodig is om calcificatie tegen te gaan. Daarnaast zijn er risico’s verbonden aan het slikken van vitamine K verminderde medicijnen die vooral in mensen met het rs1800801-T variant voor een nog grotere kans op artrose kunnen zorgen.

Verlaging van schildklierhormoon als mogelijke behandeling in artrose

De kraakbeencel verliest tijdens het artrose proces zijn volwassen status en zet processen aan die normaal vooral bij botgroei vanuit de groeiplaat gezien worden. Meerdere genen betrokken bij groeiplaat verbening zijn geïdentificeerd als artrose risico genen, zoals bijvoorbeeld DIO2. Het DIO2 gen codeert voor het enzym dat verantwoordelijk is voor de intracellulaire omzetting van inactief (T4) naar actief schildklierhormoon tri-joodthyronine (T3). Van T3 was al bekend dat deze een hele belangrijke rol speelt bij de botgroei vanuit de groeiplaat. In een eerder menselijk 3D model waar kraakbeen wordt gemaakt is aangetoond dat teveel T3 niet goed is voor kraakbeen en dat het verlagen van DIO2 eiwit activiteit juist wel goed is voor kraakbeen. Echter, dit werd onderzocht in een 3D in vitro model van nieuw aangemaakt kraakbeen.

In **hoofdstuk 5** kijken we daarom in verouderd humaan kraakbeen of behandeling met iopanoic acid (IOP), een remmer van DIO2 activiteit, de schade van overbelasting verminderd. Voor toekomstige toepassingen is in dit onderzoek ook gekeken of langzame afgifte van IOP uit zogenaamde nanoparticles, een soort eiwit-kooi wat de IOP beschermt van de omgeving, net zo effectief is. In dit onderzoek zagen we dat IOP in staat was om de kraakbeencel te beschermen van de ‘ongezonde’ gen expressie dat aangezet wordt door overbelasting en dat langzame afgifte van IOP minder efficiënt was. Daarnaast werd ook gemeten dat verlagen van schildklierhormoon de schade aan kraakbeenweefsel geïnduceerd door mechanische belasting verminderde. Om uit te zoeken via welk mechanisme IOP de kraakbeencel beschermt is er een genomwijde genexpressie analyse gedaan op de kraakbeencel. Hieruit kwam naar voren dat een aantal genen betrokken bij metabole processen (INSIG1, DHCR7, FADS1 en ACAT2) en celdeling en cel differentiatie (CTGF, BMP5 en FOXM1) belangrijk zijn voor bescherming door IOP.

Conclusie en toekomstige toepassingen

In ons onderzoek is een verouderd menselijk model opgezet dat voor vele toepassingen gebruikt kan worden. Dit model is nuttig voor zowel kennisvergaring als voor medicijn onderzoek. Daarnaast kan onze data nu al dienen als een referentie om 3D modellen van het gewricht te avanceren naar een gewricht-op-een-chip. Ook geeft ons model de mogelijkheid voor diepere moleculaire exploratie van verstoord versus niet-verstoord weefsel door bijvoorbeeld RNA-sequencing op celniveau wat weer kan leiden tot identificatie van targets voor medicijnen en/of behandelingen. Ten slotte kunnen de verschillende versturende stimuli en hun variatie in effect helpen bij het opzetten van nieuwe persoonlijke behandelingen die meer gebruik maken van de verschillende subtypes van artrose. Door gebruik te maken van een zoals hier gepresenteerd verouderd menselijk biopt model kan het artroseveld en de farmacie nieuwe zo hoog nodige effectieve medicijnen voor artrose identificeren. Als bewijs van dit principe is in het biopt model onderzocht of verlaging van schildklierhormoon, d.m.v. IOP, de versturende effecten van overbelasting kan tegengaan. Hier werd geobserveerd dat het verlagen van de metabole activiteit van kraakbeencellen een gunstig effect heeft op de ‘gezonde’ gen expressie en kraakbeenafbraak inderdaad deels tegengaat.

Onze studies tonen aan dat er nog veel onbekend is over de moleculaire processen betrokken bij overbelasting in kraakbeen en bot, maar dat hier zeker nog veel kansen voor onderzoek liggen en dat hierbij rekening moet worden gehouden met leeftijd van het weefsel. Hier ligt de

kans om wetenschappelijk gegronde bewegingsbehandelingen te genereren door markers te onderzoeken na overbelasting in bipten van verschillende leeftijdsgroepen. Het mooiste zou zijn als deze markers gekoppeld kunnen worden aan markers die in het bloed of urine gemeten kunnen worden (biomarkers) omdat dit minder invasief en makkelijker af te nemen is.

Ten slotte komt uit onze studies naar voren dat er voorzichtigheid geboden moet zijn bij het gebruik van vitamine K verlagende bloedverdunners, zoals warfarine en coumarines, en dat er overwogen moet worden of er in veel gevallen overgestapt kan worden naar direct werkende orale antistollingsmiddelen (DOAC's). Deze verandering in behandeling is zeker belangrijk voor mensen die dragers zijn van het risico variant in MGP, waardoor ze van zichzelf al minder MGP eiwitten hebben en meer risico op o.a. aderverkalking en artrose. Door een tekort aan vitamine K zal er nog minder functioneel MGP eiwit zijn en meer verkalking van aderen en kraakbeen plaatsvinden. Daarnaast geeft dit onderzoek ook aan dat toedienen van vitamine K bij een subgroep van mensen die weinig vitamine K hebben een mogelijke behandeling kan zijn om artrose tegen te gaan. Dit moet echter nog verder onderzocht worden.