



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring senescent chondrocytes during aging: sleeper AGEnts of osteoarthritis

Boone, I.

Citation

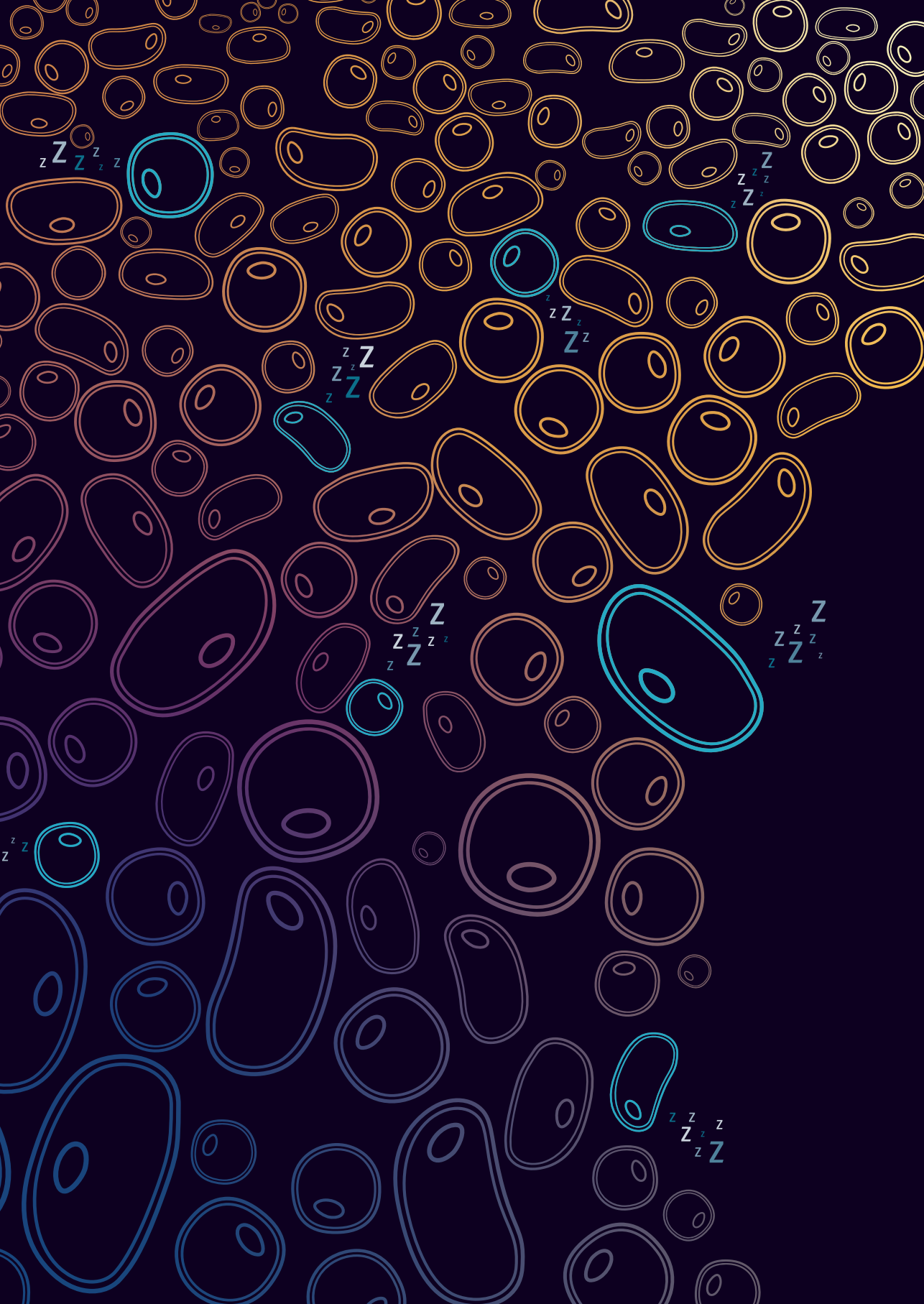
Boone, I. (2025, October 17). *Exploring senescent chondrocytes during aging: sleeper AGEnts of osteoarthritis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4273547>

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/1887/4273547>

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





z^z
z^z

CHAPTER 9

Appendix

Nederlandse samenvatting

Artrose is een veelvoorkomende, pijnlijke en leeftijdsgerelateerde gewrichtsaandoening, die wereldwijd naar schatting 595 miljoen mensen trof in 2020. De prevalentie blijft toenemen, mede door de vergrijzing en de accumulatie van leeftijdsgebonden risicofactoren, waaronder gewrichtsblessures. Ondanks de grote maatschappelijke en economische impact bestaan er nog geen effectieve behandelingen die het ziekteproces kunnen remmen of keren.

De complexiteit van artrose ligt in het samenspel van biologische processen zoals ontsteking, mechanische stress, mitochondriale disfunctie en cellulaire veroudering (senescentie). Kraakbeendegeneratie en veranderingen in het onderliggende bot zijn kenmerkend, terwijl kraakbeen van nature een beperkt regeneratief vermogen heeft.

Veroudering van kraakbeen gaat gepaard met weefselverlies, verminderde hydratatie en afname van chondrocyten. Een belangrijk verouderingsmechanisme is cellulaire senescentie, waarbij cellen stoppen met delen en actief schadelijke factoren (SASP) uitscheiden. Hoewel senescentie fysiologisch voorkomt bij wondgenezing en tumoronderdrukking, draagt het ook bij aan ouderdomsziekten zoals osteoporose, diabetes type 2, neurodegeneratie en artrose.

Doel van dit proefschrift

Het doel van dit proefschrift is om beter inzicht te verkrijgen in de rol van cellulaire senescentie in de pathofysiologie van artrose. Dit wordt onderzocht door senescentie te karakteriseren in genexpressieprofielen van het kraakbeen van artrosepatiënten. Naast het identificeren van verschillende profielen is het van groot belang om deze subgroepen van patiënten ook klinisch te kunnen herkennen, bij voorkeur via niet-invasieve biomarkers. Dergelijke biomarkers kunnen persoonsgebonden, intrinsieke overlevingsstrategieën van het lichaam weerspiegelen en zijn essentieel om patiëntgericht en effectiever te kunnen behandelen.

Om een volgende stap te zetten in de ontwikkeling van behandelingen tegen artrose, is het opzetten van relevante humane preklinische modellen die senescentie nabootsen van cruciaal belang. Hierbij is er behoefte aan zowel snelle screeningsmodellen voor geneesmiddelontwikkeling als meer complexe humane modellen voor validatie. Om vervolgens beter te kunnen begrijpen wat op cellulair en weefselniveau verandert in deze modellen, kunnen geavanceerde beeldvormingstechnieken zoals synchrotron microscopie worden ingezet voor het detecteren van subtiele driedimensionale structurele veranderingen. Ten slotte is er in dit proefschrift ook gekeken naar innovatieve modelontwikkeling, waaronder de toepassing van 'joint-on-a-chip'-technologie. Deze benadering biedt perspectief voor het verder personaliseren van medicijntesten, met als uiteindelijk doel: de juiste behandeling bij de juiste patiënt.

Senescentie geassocieerde artrose endotypen in kraakbeen

Geen mens is hetzelfde, en dit wordt weerspiegeld in onze genetische profielen. Artrose (OA) is een heterogene aandoening; patiënten verschillen in genetische aanleg, ziekteverloop en respons op behandelingen. Binnen deze variatie zijn subgroepen te onderscheiden op basis van moleculaire kenmerken, zogenaamde endotypen. De aanwezigheid van deze heterogeniteit maakt het lastig om veelbelovende therapieën uit laboratoriumonderzoek succesvol te vertalen naar klinische toepassingen. Om gepersonaliseerde behandelingen mogelijk te maken, is het essentieel om

stabiele moleculaire endotypen te identificeren.

In **hoofdstuk 2** onderzochten we de aanwezigheid van senescentie-geassocieerde groepen in de genexpressieprofielen van het kraakbeen van artrosepatiënten, waarbij we twee duidelijke senescente endotypen konden onderscheiden. Patiënten behorend tot endotype 1 vertoonden verhoogde cellulaire activiteit, met een prominente rol voor *FOXO*-genen. In endotype 2 domineerden daarentegen inflammatoire processen, waarbij matrixmetalloproteïnases (*MMP's*) betrokken waren. Deze bevindingen benadrukken de biologische diversiteit van kraakbeen bij OA-patiënten.

Naast het karakteriseren van deze endotypen is het van groot belang om deze subgroepen ook klinisch te kunnen herkennen op basis van niet-invasieve biomarkers. Door metabolieten in het bloed van dezelfde OA-patiënten te analyseren, identificeerden we twee corresponderende metabole profielen. Deze kunnen dienen om patiënten te classificeren in één van de twee senescente endotypen. Om de nauwkeurigheid van dit classificatiemodel verder te verbeteren, zou het waardevol zijn om aanvullende biomarkers te integreren, bijvoorbeeld op het niveau van transcriptomics of proteomics.

Humane kraakbeen modellen voor medicijnontwikkeling

Preklinische laboratorium modellen zijn fundamenteel voor succesvolle medicijnontwikkeling. Ondanks het maatschappelijke besef voor dierenwreedheid en daardoor het verlangen om dierproeven te verminderen staan de diermodellen helaas nog bekend als de 'gouden standaard' en worden deze dus vaak gebruikt in (senescentie) onderzoek. Dit komt onder andere door het gelimiteerde aantal gevalideerde en geaccepteerde menselijke modellen.

Modelleren van senescentie in humane *ex vivo* osteochondrale modellen

In **hoofdstuk 3** onderzochten we de inductie van senescentie in humane *ex vivo* osteochondrale explanten door middel van mechanische belasting en ioniserende straling. In dit model wordt een biopt genomen bestaande uit kraakbeen en onderliggend bot, dat vervolgens in het laboratorium verder wordt gekweekt. Door mechanische belasting en ioniserende straling afzonderlijk én in combinatie toe te passen, ontwikkelden we drie experimentele modellen met elk specifieke senescente kenmerken. Toepassing van alléén mechanische belasting, een artrosespecifieke prikkel, leidde tot een uitgesproken inflammatoir profiel in het kraakbeen, met betrokkenheid van onder andere *SERPINE1* en *IL8*. Bij toepassing van alleen ioniserende straling werd daarentegen vooral een remming van de celdeling waargenomen, zonder duidelijke ontstekingsreactie. Wanneer beide stimuli gecombineerd werden, ontstond een volledig senescent fenotype, gekenmerkt door zowel inflammatie als een remming van de celdeling. Deze bevindingen suggereren dat specifieke prikkels elk unieke aspecten van senescentie in chondrocyten activeren. De resultaten van dit onderzoek wijzen op een centrale rol voor *CDKN1A* (p21) als regulator van chondrocyt senescentie in dit model.

Kwantificeren van kraakbeenschade met behulp van 3D microscopie

Om subtiele veranderingen te kunnen detecteren in behandelde humane osteochondrale modellen, is het essentieel om de driedimensionale structuur van het kraakbeen — inclusief de chondrocyten — nauwkeurig te visualiseren. In **hoofdstuk 4** maakten we gebruik van geavanceerde synchrotron-microscopie om structurele veranderingen te analyseren in gestimuleerde osteochondrale

explants. Hiermee konden we zowel individuele cellen als zonale verdelingen binnen het kraakbeen in beeld brengen en kwantificeren.

Hieruit kwam naar voren dat mechanische belasting specifieke veranderingen induceert in het kraakbeen, terwijl het eerst toepassen van ioniserende straling deze respons juist onderdrukt. Daarnaast werd een toename in celgrootte waargenomen na bestraling. Beide observaties zijn kenmerkend voor cellulaire senescentie en suggereren dat senescente chondrocyten weliswaar overleven, maar hun vermogen verliezen om adequaat te reageren op omgevingsprikkels.

Behandeling van senescente processen bij artrose – een proof-of-concept studie

Om de osteochondrale modellen te valideren als testplatform voor eventuele artrose behandelingen, onderzochten we in **hoofdstuk 6** de effecten van NF157 op senescente eigenschappen binnen het model. Incubatie met NF157 leidde tot een duidelijke afname van zowel het SASP-profiel als het algemene senescentieprofiel van de explant.

De rol van het SASP-profiel kwam eerder al naar voren in zowel de humane modellen als de genexpressiegegevens uit **hoofdstuk 2**, waarin het werd geïdentificeerd als een belangrijke schakel in het inflammatoire proces bij artrose. Deze bevindingen benadrukken de potentie van het SASP als therapeutisch aangrijpingspunt bij de behandeling van artrose.

Humane *in vitro* kraakbeenorganoïden

Zoals hierboven beschreven zijn de humane osteochondrale modellen dus realistische en waardevolle modellen die kunnen worden gebruikt bij het onderzoek naar senescentie in artrose. Een belangrijke beperking van deze modellen is echter dat ze relatief tijdsintensief zijn en minder geschikt voor grootschalige screenings. Voor vroege medicijntesten vormen *in vitro* kraakbeenorganoïden daarom een efficiënter alternatief.

In **hoofdstuk 3** toonden we aan dat een geminiaturiseerde versie van dit organoïdemodel geschikt is voor het bestuderen van senescentie. In **hoofdstuk 7** passen we hetzelfde model toe om terminale differentiatie van chondrocyten – geïnduceerd door het schildklierhormoon triiodothyronine (T3) – te analyseren.

Behandeling van onderliggende processen bij artrose

Naast senescentie spelen ook andere biologische processen een rol in de progressie van artrose. In **hoofdstuk 7** hebben wij mogelijke behandelingsstrategieën onderzocht gericht op terminale differentiatie van chondrocyten. Dit is een proces waarbij chondrocyten een hypertrofisch fenotype laten zien, kraakbeen beginnen af te breken en uiteindelijk in apoptose gaan. Aangezien schildklierhormonen, met name T3, eerder zijn gelinkt aan artrose en deze vorm van chondrocyt differentiatie, hebben wij dit hormoon gebruikt om het proces in onze modellen te induceren.

Verschillende geneesmiddelen zijn eerst getest in het *in vitro* organoïdemodel, waarna de meest veelbelovende middelen verder zijn geëvalueerd in het osteochondrale explantmodel. In beide systemen zagen we een duidelijke vermindering van terminale differentiatie, wat de waarde van deze gecombineerde modelstrategie onderstreept.

Onderzoek naar de bot-kraakbeen interactie met behulp van een “joint-on-a-chip”

Hoewel het kraakbeen-organoïdemodel geschikt is voor snelle screenings, ontbreekt in dit eenvoudige 3D-model de mogelijkheid om de interactie tussen bot en kraakbeen te bestuderen. Voor dit doel is een complexer systeem nodig, zoals de zogeheten ‘joint-on-a-chip’, een gepersonaliseerd micro fysiologisch systeem dat meerdere weefseltypes integreert. Door gebruik te maken van patiënt-eigen cellen biedt het mogelijkheden om persoonsgebonden medicijnresponsen te testen. In **hoofdstuk 5** presenteerde we de ontwikkeling van een chipmodel waarin de bot-kraakbeeninteractie wordt gereproduceerd zonder het gebruik van een hydrogel. Dit systeem maakt het mogelijk om verschillende uitkomstmaten, zoals eiwit- en RNA-expressie, te analyseren. In de toekomst kan dit model worden aangepast om specifieke artrose processen, zoals senescentie, nauwkeuriger te bestuderen.

Een geïntegreerde modelstrategie voor medicijnontwikkeling

Elk van deze modellen heeft zijn eigen voor- en nadelen, en de keuze voor een specifiek model hangt sterk af van de onderzoeksvraag. Ons voorstel is om gebruik te maken van een stapsgewijze pre-klinische strategie voor de evaluatie van potentiële artrose geneesmiddelen. Hierbij wordt gestart met een snelle screening in het humane kraakbeen-organoïdemodel, gevolgd door validatie in het complexere osteochondrale explantmodel. Deze aanpak combineert namelijk schaalbaarheid met fysiologische relevantie en vormt daarmee dus een robuust platform voor de ontwikkeling van persoonsgerichte therapieën voor artrose.

Conclusie en toekomstperspectieven

In dit proefschrift hebben we aangetoond dat senescentie een belangrijke rol speelt in artrose en in verouderd weefsel. Onze bevindingen benadrukken het belang van representatieve, humane modellen om deze processen realistisch te kunnen onderzoeken. Door het in kaart brengen van senescente genexpressieprofielen in kraakbeen van artrosepatiënten en het testen van senescentie-inducerende triggers in verschillende experimentele modellen, kwam een duidelijke rol van *CDKN1A* naar voren in senescente chondrocyten.

Toch is er nog veel onbekend over de rol van senescentie in de vroege stadia van artrose. Een belangrijke vervolgstap is het identificeren van betrouwbare in vivo markers voor chondrocytaire senescentie. De senescente osteochondrale explantmodellen die in **hoofdstuk 3** zijn ontwikkeld, kunnen hierin een waardevol hulpmiddel zijn.

Senescentie vormt, gezien de vele mogelijke aangrijpingspunten, een veelbelovend behandelpunt voor artrose. Ondanks het uitblijven van succes in eerdere klinische trials, is het van groot belang om het onderzoek naar senolytische en senomorfe therapieën voort te zetten. Hierbij moet meer aandacht worden besteed aan de heterogene aard van artrose, bijvoorbeeld door gebruik te maken van niet-invasieve biomarkers om patiëntsubgroepen te identificeren, en door het inzetten van passende humane modellen. Alleen met deze geïntegreerde benadering kunnen we toewerken naar effectieve en persoonsgerichte behandelingen voor artrose.