



## **BALANS: BUIGEN OF BARSTEN**

**HANS VAN LEEUWEN**

---



**BALANS: BUIGEN OF BARSTEN**

Oplage 1000  
Omslagfoto Levien Willemse, Rotterdam  
Ontwerp Ontwerpwerk, Den Haag  
Drukwerk Demmenie Grafimedia, Alphen aan den Rijn

ISBN 97-8907790-64-46

© Johannes P.T.M. (Hans) van Leeuwen, oratiereeks Erasmus MC  
1 juni 2007

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd zonder voorafgaande toestemming van de auteur.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van art. 16h t/m 16m Auteurswet 1912 j°. Besluit van 27 november 2002, Stb. 575, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoeding te voldoen aan de Stichting Reprorecht te Hoofddorp (Postbus 3060, 2130 KB).

# BALANS: BUIGEN OF BARSTEN

REDE

In verkorte vorm uitgesproken  
ter gelegenheid van het aanvaarden  
van het ambt van bijzonder hoogleraar  
met als leeropdracht Calcium- en Botstofwisseling  
aan het Erasmus MC, faculteit van de  
Erasmus Universiteit Rotterdam  
op 1 juni 2007

door

JOHANNES P.T.M. (HANS) VAN LEEUWEN



*Mijnheer de Rector Magnificus,  
Mijnheer de Decaan,  
Leden van het College van Bestuur van de Erasmus Universiteit Rotterdam,  
Leden van de Raad van Bestuur van het Erasmus Medisch Centrum,  
zeer gewaardeerde familie, vrienden, collega's en overige toehoorders,*

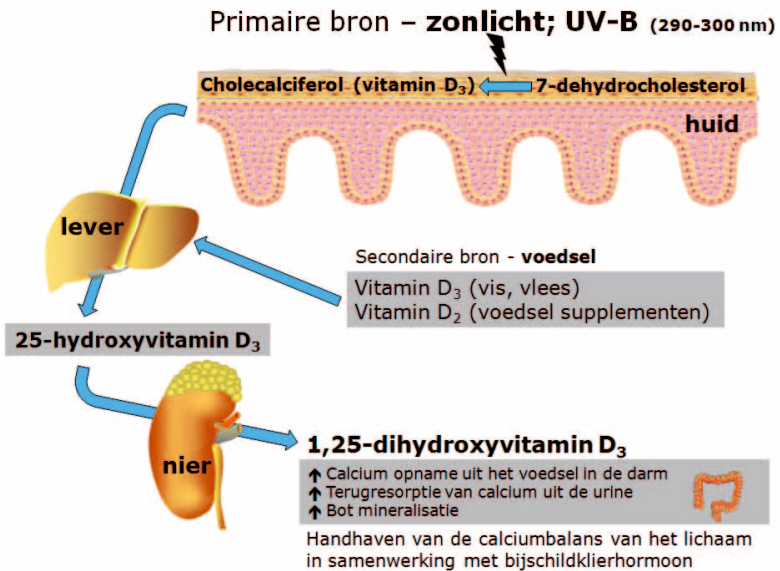
## **Inleiding**

**T**ijdens de voorbereiding op deze lezing kwam ik tot de conclusie dat er een duidelijke rode draad is, die loopt van mijn middelbare school, studiekeuze en keuzes binnen de studie naar mijn huidige werkzaamheden en leeropdracht. Centraal hierin staan de regelmechanismen die een organisme optimaal laten functioneren in zijn/haar omgeving en het organisme in balans doet zijn. Het organisme kan buigen; dat wil zeggen goed of voldoende reageren op veranderingen en het kan zich dan aanpassen aan veranderende omstandigheden. Het kan echter ook barsten bij foutief functioneren in geval van ziekte. Bij de handhaving van de balans zijn niet alleen interne (in het organisme) regelmechanismen betrokken, ook speelt de communicatie tussen het externe en interne milieu; de gen-omgevingsinteracties, een grote rol. In deze lezing zal ik de rode draad uiteenzetten en hoe deze verband houdt met mijn leeropdracht Calcium- en Botstofwisseling.

In retrospect zijn gen-omgevingsinteracties één van de drijfveren geweest om ooit biologie te gaan studeren. Op de middelbare school heb ik experimenten gedaan met planten. Ik bestudeerde de betekenis van voedingsstoffen en de aanwezigheid van licht op de groei. Het was fascinerend om te zien dat soms slechts kleine variaties in externe factoren, bijvoorbeeld voedingsstoffen in het water, of de aanwezigheid en de richting van licht van zeer groot belang zijn voor de mate en richting van groei. Het zijn deze aspecten die ook zeer belangrijk zijn voor de balans in de calcium- en botstofwisseling en die in mijn onderzoekslijn en leeropdracht terugkomen. De meest

duidelijke voorbeelden hiervan zijn dieet en het hormoon vitamine D. Ten eerste: de samenstelling van dieet en aanwezigheid of afwezigheid van bepaalde nutriënten, in het bijzonder calcium en fosfaat, is zeer belangrijk voor het aanzetten van interne controlemechanismen. Ten tweede: in directe relatie met het licht in het middelbare school plantenonderzoek: vitamine D. Vitamine D is een zeer belangrijk calcium- en botstofwisseling regulerend hormoon. Vitamine D wordt onder invloed van zonlicht in de huid gemaakt waarna in de lever en uiteindelijk in de nier het volledig actieve vitamine D ontstaat (Figuur 1) Deze laatste activatiestap staat direct onder controle van de calciumconcentratie in het bloed.

In het vervolg zal ik de onderdelen die een centrale plaats in het onderzoek hebben gehad en in de toekomst een belangrijke plaats in het onderzoek zullen hebben meer in detail bespreken.

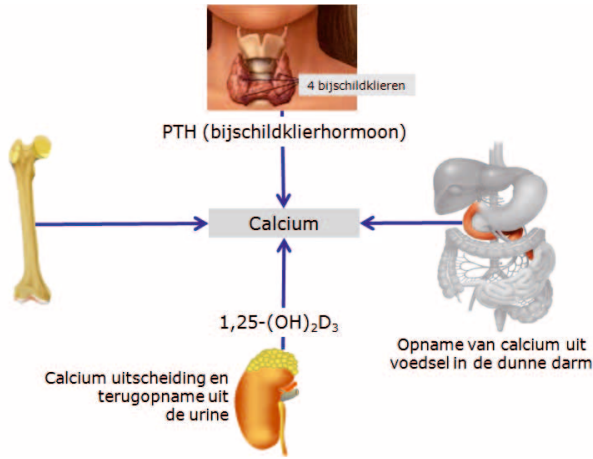


Figuur 1: Overzicht van vitamine D bronnen. Stapsgewijze synthese in de huid, lever en uiteindelijk in de nier het biologisch actieve 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Tevens kan vitamin D worden opgenomen vanuit het voedsel.



## Calcium homeostase

**H**omeostase omvat alle processen die er toe bijdragen om een systeem in balans te houden. Voor calcium betekent dit het handhaven van een balans, zodat de bloedcalciumconcentratie, de calciumwaarde, in het lichaam stabiel blijft. Zodra de calciumconcentratie van de norm afwijkt, komt het lichaam in actie. Calcium is wat dit betreft een bijzonder ion. In vergelijking met andere ionen wordt de bloedcalciumwaarde zeer nauwkeurig gereguleerd. Deze nauwkeurige regulatie is belangrijk, omdat calcium een cruciaal ion is voor bijna alle processen in de het lichaam. Het speelt een essentiële rol in lichaamsfuncties zoals: spiercontractie, zenuwgeleiding en bloedstolling. Daarnaast is calcium een belangrijk bestanddeel van bot. Het is van belang voor de functie en de uiteindelijke sterkte van bot. Tevens is bot een reservoir voor calcium in het geval van “nood”, bijvoorbeeld bij een geringe aanvoer vanuit het dieet of bij een te hoge uitscheiding via de nier. Voor calcium homeostase is de interactie tussen het externe milieu, de interne controlemechanismen en ook de interactie tussen de verschillende organen zeer belangrijk. De belangrijkste organen die direct betrokken zijn bij de calcium homeostase zijn: de darm, de nier, het bot en de bijschildklier (Figuur 2).

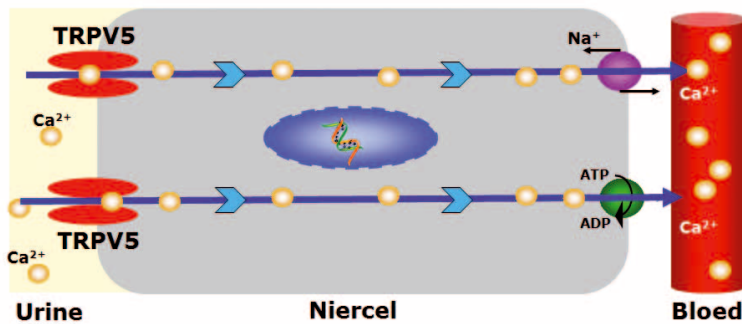


Figuur 2: Schematisch overzicht van de organen die de belangrijkste rol spelen bij het handhaven van de calcium homeostase.

Bij een verstoring in de calcium homeostase, bijvoorbeeld doordat er vanuit de omgeving (de darm) een te laag aanbod aan calcium is, zal de bloedcalciumwaarde dalen. In directe reactie hierop zal de bijschildklier de synthese van het bijschildklierhormoon, parathyreoid hormoon (PTH), verhogen. PTH zal in de nier

de productie van actief vitamine D stimuleren en tegelijkertijd de terugopname van calcium uit de urine stimuleren. Dit zal al een eerste direct positief effect op de bloed calciumwaarde hebben. Vitamine D zal in de darm de calciumopname stimuleren. Al deze acties leiden ertoe dat de verlaagde bloedcalciumwaarde stijgt en weer hersteld wordt. In elk goed gereguleerd systeem is er niet alleen een inschakelmechanisme, maar ook een uitschakelmechanisme om weer de optimale balans te bereiken. Dit wordt geregeld door terugkoppelings-, ofwel feedbackmechanismen. In dit geval bestaat het uitschakelmechanisme uit calcium en vitamine D zelf. De stijging van de bloedcalciumwaarde en vitamine D remt niet alleen de PTH productie, maar ook de verhoogde productie van vitamine D en stimuleert bovendien de afbraak van vitamine D.

Al de kennis over de mechanismen van deze processen is het gevolg van gedetailleerd fysiologisch, moleculair en cellulair onderzoek. Kennis van deze mechanismen is cruciaal voor het begrijpen hoe pathologische condities kunnen ontstaan en hoe therapeutische behandelingen en diagnostiek ontwikkeld kunnen worden.



Figuur 3: Schematische weergave van het transcellulaire calciumtransport in de nier met daarin een sleutelrol voor TRPV5 bij de opname van calcium in de cel. Voor het transcellulair calciumtransport in de darm geldt hetzelfde schema. Daar speelt echter TRPV6 de belangrijkste rol in plaats van TRPV5.

Een recent voorbeeld hiervan is één van de belangrijkste calciumtransportmoleculen, TRPV5, dat door collega's in Nijmegen geïdentificeerd is. Dit is een cruciaal molecuul voor transcellulair calciumtransport in de nier bij de terugopname van calcium uit de urine richting bloed (Figuur 3). In transgene muizen waar dit transportkanaal is geïnactiveerd vind er geen terugresorptie van calcium in de nier plaats. Dit toont echter ook meteen de schoonheid van de biologie en het feedbackproces zoals net beschreven. Het sterk verhoogde verlies van calcium in de nieren leidt direct tot een toename van vitamine D-productie. De verhoogde vitamine D productie heeft tot

gevolg dat er op darm niveau een compensatoire reactie optreedt en de calciumopname uit het voedsel sterk toeneemt<sup>1</sup>. In samenwerking met de afdeling Celfysiologie van het Radboud Universitair Medisch Centrum in Nijmegen hebben we aangetoond dat alle calciumtransporteiwitten die in de nier en darm aanwezig zijn ook in zowel de botvormende cellen, de osteoblasten, als de botafbrekende cellen, de osteoclasten, aanwezig zijn. De vraag is: wat is de functie van deze eiwitten in bot? Met behulp van het muismodel dat dit calcium transportkanaal mist, hebben we aan kunnen tonen dat TRPV5 een zeer belangrijke rol speelt bij de werking van de osteoclasten. Wanneer functioneel TRPV5 ontbreekt, ontstaan grote, gefrustreerde osteoclasten die zeer slecht bot afbreken<sup>2</sup>. Op dit moment richt het onderzoek zich op verdere functionele karakterisatie van deze eiwitten in de botstofwisseling, in het bijzonder in relatie tot veroudering en hormonale veranderingen.

De impact van veroudering op de calcium homeostase wordt bestudeerd op het niveau van de patiënt en populatie en in dierexperimentele modellen. Eén van de interessante en verrassende bevindingen is dat tijdens veroudering de serum calciumwaarden tussen mannen en vrouwen gaan verschillen. De exacte oorzaak en gevolgen van deze relatief kleine verschillen zijn nog onduidelijk. Echter een kleine verschuiving in het regelmechanisme van de calcium- en botstofwisselingsbalans zal tot gevolg kunnen hebben dat bij veroudering het organisme bij veranderingen in calciumwaarden, zoals eerder besproken, niet voldoende mee kan buigen om de balans te herstellen en op den duur zal kunnen barsten. Gezien het feit dat de verschillen tussen mannen en vrouwen alleen in de groep ouder dan 55 jaar wordt waargenomen, lijkt een rol voor de menopauze en de veranderingen in oestradiolproductie logisch. In eerder onderzoek hebben we aangetoond dat oestradiol naast vitamine D betrokken is bij calciumopname uit de darm<sup>3</sup>. Interessant in deze is dat we tijdens veroudering ook geslachtsverschillen in vitamine D spiegels waarnemen. Dit zien we ook bij muizen. Dit biedt de mogelijkheid om mechanismen van deze veranderingen en verschillen op te helderen door het proces in de muis te bestuderen en te vertalen naar de mens.

Een treffend voorbeeld betreffende het belang van de omgeving op het behouden van de balans komt uit een onderzoek met Komodovaranen dat we gedaan hebben in samenwerking met Diergaarde Blijdorp. Komodovaranen leven in het wild op een breedtegraad waar veel meer zon is dan in Nederland. De verminderde blootstelling aan zonlicht is niet alleen het geval in Blijdorp, maar dit is wereldwijd een probleem in dierentuinen. Het mag na bovenstaande duidelijk zijn dat dit een effect heeft op de vitamine D productie in de huid. Het blijkt dat veel jonge komodovaranen in gevangenschap problemen hebben en botfracturen kunnen hebben mogelijk ten gevolge van inadequate vitamine D vorming door gebrek aan adequate blootstelling aan UV-B. Vitamine D spiegels zijn in gevangenschap circa 8x lager dan in het wild, respectievelijk 20-30 versus circa 200 nmol/liter. Toen een Komodovaraan voor negen maanden “op vakantie” naar Gran Canaria ging was na afloop de vitamine D spiegel

gestegen naar 272 nmol/liter. Enige jaren geleden hebben we in samenwerking met Diergaarde Blijdorp ook vitamine D metingen gedaan vóór en na het huisvesten in een kooi met speciale UV-B lampen die ontwikkeld waren door de Technische Universiteit Delft. Na vier maanden was de vitamine D spiegel gestegen tot 201 nmol/liter |<sup>4</sup>.

Ernstige voorbeelden van vitamine D deficiëntie zijn ook zichtbaar bij leguanen die in gevangenschap worden gehouden en dan met name in een niet professionele omgeving. Als gevolg van Jurassic Park is er een sterke toename geweest van de wens om thuis een leguaan te hebben. Deze worden vaak gevoed met smeerkaas en sla; voedsel dat bijna geen vitamine D bevat. Bovendien schiet de UV-B voorziening ernstig tekort omdat deze minder is dan in hun natuurlijke omgeving. Dit heeft ernstige vitamine D deficiënties tot gevolg met als consequentie dramatische effecten zoals osteoporose en osteopenia (Figuur 4). Net als voor de Komodovaranen zijn er nu speciale lampen, b.v. Reptile UV, te koop voor de nodige stimulatie van vitamine D synthese.



Figuur 4: Foto van een vitamine D deficiënte leguaan die in gevangenschap is gehouden zonder voldoende UV-B voorziening en voorzien van adequate calcium hoeveelheden bevattend voedsel. Tegenwoordig zijn er commercieel verkrijgbare UV-B lampen voor reptielen (zie insert). Foto beschikbaar gesteld door Dr. Holick, Boston University School of Medicine, Boston, USA.

Vorig jaar is in Blijdorp een onderzoek gedaan naar calcium homeostase bij olifanten waarbij wij de vitamine D waarden hebben bepaald. Olifanten in gevangenschap hebben vaak problemen bij de bevalling en hebben een lage botmineraaldichtheid. Op röntgenfoto's is bijna geen corticaal bot te zien in de staartwervels. De resultaten van het experiment wijzen er op dat olifanten in gevangenschap waarschijnlijk hypocalcemisch zijn, dat wil zeggen een te lage bloedcalciumwaarde hebben. Dit lijkt ook te passen bij waarnemingen van onwillekeurige spiertrillingen die worden waargenomen bij olifanten in gevangenschap. Een probleem bij dit soort studies met diertuindieren is dat normaalwaarden voor bloedcalcium bij olifanten, zoals die geregistreerd zijn door het ISIS (International Species Information System

(www.isis.org), gebaseerd zijn op het gemiddelde van bijvoorbeeld 1100 olifanten in gevangenschap. Na het calciumrijke voer nam de serum calciumwaarde toe van 2.65 naar 3,58 mmol/liter hetgeen overeenkomt met sporadische waarnemingen bij olifanten in het wild. Dit betekent dat waarschijnlijk olifanten in gevangenschap hypocalcemisch zijn. Naast olifanten zijn meer dieren hypocalcemisch en vitamine D deficiënt. We hebben reeds analyses gedaan bij flamingo's en leguanen en op dit moment onder andere ook bij schildpadden. Er is een breed scala van gevolgen van langdurige verstoringen in de serum calciumwaarden waaronder bot- en spierproblemen maar ook neuropsychiatrische problemen zoals angsten en depressie. Er zijn gegevens over vitamine D deficiëntie en breinontwikkeling en over schizofrenie en depressie<sup>5-8</sup>.

Waarom ik deze voorbeelden van de komodovaranen, leguanen en olifanten bespreek, is om aan te geven hoe belangrijk het is om kennis te hebben van de natuurlijke woon/ leefomgeving en voedingssamenstelling. Het zijn ook perfecte voorbeelden van gen- omgevingsinteractie en vergelijkbaar met de eerder genoemde plantenexperimenten. Bovendien kunnen deze experimenten en analyses ook vertaald worden naar situaties die kunnen worden aangetroffen bij mensen die in Nederland zijn komen wonen. Deze mensen zijn vaak afkomstig uit streken met andere leefgewoontes en diëten en waar ook vaak meer zonuren zijn. Als deze mensen in Nederland niet vaak buiten komen en ook nog kleding dragen die de huid bijna volledig bedekt dan zal duidelijk zijn dat er een vitamine D te kort zal ontstaan en bij een niet adequaat dieet ook te lage bloedcalciumwaarden. Dit zal uiteindelijk kunnen leiden tot botontkalking en andere problemen (Figuur 5)<sup>9</sup>.

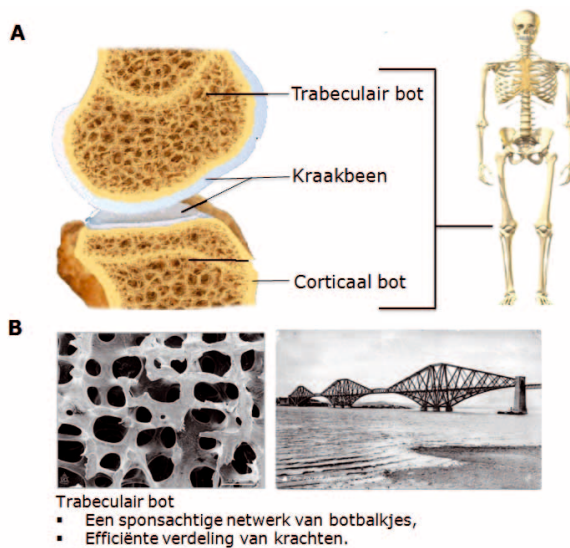


Figuur 5: Twee voorbeelden van condities die aanleiding geven tot vitamine D deficiëntie. Linker panel: volledig bedekte moslima's; rechter panel: hulpbehoevende ouderen in verpleeghuizen die beperkt mobiel zijn en niet meer buiten in de zon komen.

De onderzoeken bij Komodovaranen en olifanten wijzen er op dat een optimale samenstelling van het dieet zeer belangrijk is en dat de vereisten met de leeftijd kunnen verschillen. In dit verband is het van belang om te denken aan de ouderen

in onze samenleving en hun leefomstandigheden in bijvoorbeeld verpleeghuizen. Ouderen hebben als gevolg van verminderde nierfunctie al een verminderde capaciteit om vitamine D te produceren. Daarbij komt ook nog eens dat deze ouderen bijna niet meer buiten komen en misschien niet het voor hun leeftijd optimale, voldoende dieet krijgen. Het is dus cruciaal dat er een optimaal dieet is met name in condities zoals bij veroudering en verblijf in een niet natuurlijke omgeving. Daarnaast mag het duidelijk zijn dat zon goed voor u is. Ook hier geldt de balans tussen enerzijds voldoende blootstelling aan zonlicht zonder antizonnebrand voor optimale vitamine D vorming en anderzijds overmatige zonblootstelling en schadelijke effecten op de huid. Gelukkig dat het Koningin Wilhelmina Fonds zich nu eindelijk heeft gerealiseerd dat UV-B en daarmee vitamine D belangrijk tegen kanker kan zijn. Zij laten hiernaar nu een literatuuronderzoek doen waarvan de resultaten pas in 2008 beschikbaar komen. Belangrijk voor Nederlanders: vitamine D onder invloed van de zon in de huid gemaakt is gratis!

---



Figuur 6: A) Overzicht van kniegewricht dat positie corticaal en trabeculair bot en kraakbeen toont. B) detail opnamen van sponsachtig netwerk van botbalkjes van het trabeculair bot. Dit netwerk van botbalkjes garandeert een efficiënte verdeling van krachten. Dezelfde principes kunnen worden waargenomen bij industriële ontwerpen (rechter panel).

## Skeletstofwisseling

Om het skeletonderzoek goed te kunnen appreciëren is het van belang dat eerst de karakteristieken en functies van het skelet worden toegelicht. Het skelet bestaat in grote lijnen uit twee typen weefsel, 1) het bot, een organische eiwitmatrix dat verkalkt is, en 2) kraakbeen, gelegen aan de uiteinden van het botweefsel in de gewrichten, dat ook bestaat uit een organische eiwitmatrix maar deze is niet verkalkt. Kraakbeen zorgt als een soort stootkussen voor de energie of schokabsorptie in de gewrichten tussen de harde botten (Figuur 6A).

Het skelet heeft een aantal zeer belangrijke functies. Ten eerste: het geeft een gewerveld organisme structuur en vorm. Ten tweede: het dient ter bescherming van de inwendige organen. Ten derde: het heeft een mechanische functie. Het is de aanhechtingsplaats van pezen en spieren en heeft daarmee een centrale plaats in ons bewegingsapparaat. Ten vierde: zoals hierboven reeds genoemd, speelt het een rol als calciumreservoir en is daarmee belangrijk voor de calcium homeostase. Ten vijfde: het bevat beenmerg en huisvest de hematopoïetische stamcellen die aan de basis staan van de vorming van rode bloedlichaampjes en de cellen van ons afweersysteem; maar ook de vorming van de botafbrekende cellen, de osteoclasten. Het feit dat deze stamcellen zich op een zo beschermde plek binnen in het bot bevinden, illustreert hoe belangrijk het afweersysteem is voor het overleven van het organisme. Ten zesde: herbergt het beenmerg een andere populatie stamcellen, de mesenchymale stamcellen. Dit zijn de cellen die aan de basis staan van de vorming van onder andere: de vetcellen, spiercellen, bindweefselcellen, en kraakbeencellen en de botvormende cellen, de osteoblasten. Hieruit mag blijken dat het skelet letterlijk en figuurlijk een zeer centrale plaats in neemt in het lichaam.

Zonder verder uitgebreid in details te treden, kunnen er in de ontwikkeling en groei twee soort botvorming onderscheiden worden: 1) desmale botvorming, waarbij er direct bot gevormd wordt; een voorbeeld is de schedel, 2) enchondrale botvorming, waarbij er eerst een kraakbeenmatrix wordt gevormd die vervolgens vervangen wordt door een gemineraliseerde botmatrix; voorbeelden hiervan zijn de pijpbeenderen zoals de femur of wel het bovenbeen en de ulna en radius of wel de onderarm. Er kunnen twee typen bot onderscheiden worden: 1) het corticale bot, dit is de botschacht aan de buitenkant die hard en compact is, en 2) het trabeculaire bot: dit is een netwerk aan botbalkjes binnen in het bot en het vormt één eenheid met het beenmerg en het zorgt voor een efficiënte verdeling van krachten (Figuur 6B). Het lijkt op structuren die bruggen stevigheid kunnen geven. De structuur kan heel mooi zichtbaar gemaakt worden in bijvoorbeeld de wervels. Het trabeculaire bot is wat betreft stofwisseling, dat is afbraak en opbouw, het actiefst en reageert het snelst op veranderingen in hormonen en de calcium homeostase.

Bot bestaat voor ongeveer 30% uit een organische of eiwitmatrix, 60 % uit mineraal, 7% uit water en minder dan 3% uit vet. De organische matrix bestaat voor circa 90%

uit collageen type I. Mutaties in collageen type I kunnen leiden tot een van mild tot zeer ernstig variërend ziektebeeld genaamd osteogenesis imperfecta; “niet perfecte botvorming”. De organische botmatrix bevat meer dan 30 verschillende niet-collageenachtige eiwitten die aan het collageen type I gebonden zitten. De functie van veel van deze eiwitten in de botmatrix is nog lang niet opgehelderd, maar ze spelen waarschijnlijk een belangrijke rol bij het initiëren en controleren van de uiteindelijke verkalking van de organische botmatrix. Bij de verkalking, of mineralisatie van bot worden er calcium en fosfaten in de organische botmatrix afgezet. Het mineraal lijkt op het geologische mineraal hydroxyapatiet ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ). De hydroxyapatietkristallen in bot zijn echter zeer klein (20 nM) en ze zijn in tegenstelling tot het geologisch mineraal niet perfect van vorm. Het kan als gevolg daarvan ook andere ionen bevatten. Dit maakt dat hydroxyapatiet in bot gemakkelijker oplosbaar is dan de vergelijkbare geologische vorm. Dit is een gunstige eigenschap gezien de functie van bot bij de controle van de calciumbalans.

De collageen/eiwitmatrix geeft bot zijn vorm, elasticiteit en flexibiliteit zodat het bij onbalans kan buigen. Het mineraal geeft het bot zijn stevigheid en sterkte om krachten die op het bot worden uitgeoefend te weerstaan en bij onbalans niet direct te barsten of te breken. Het is opmerkelijk dat over mineralisatie relatief nog zo weinig bekend is. Ten eerste: er is slechts weinig bekend over het precieze mechanisme van mineralisatie en met name de regulatie van de mate van mineralisatie. Ten tweede: het is onbekend wat de optimale mineralisatiegraad van bot is. Te weinig mineraal is niet goed, maar te veel mineraal is ook niet goed. Dan ontstaat zogenaamd “marble bone” of te wel marmerachtig bot, dat bij onbalans niet kan buigen maar direct zal barsten.

Bot is niet de enige plaats in het lichaam waar mineralisatie optreedt. Het is echter, naast de gehoorbeentjes, wel de enige plaats waar mineralisatie normaal is. In een aantal pathologische condities kan er zogenaamde ectopische mineralisatie optreden. Twee bekende voorbeelden hiervan zijn osteoartrrose waarbij er naast verlies van kraakbeen verkalking aan de zijkanten van de gewrichten optreedt en atherosclerose ofwel aderverkalking. Voor deze ziekten is het ook van belang de moleculaire mechanismen van eiwitmatrix vorming en mineralisatie te kennen en te begrijpen.

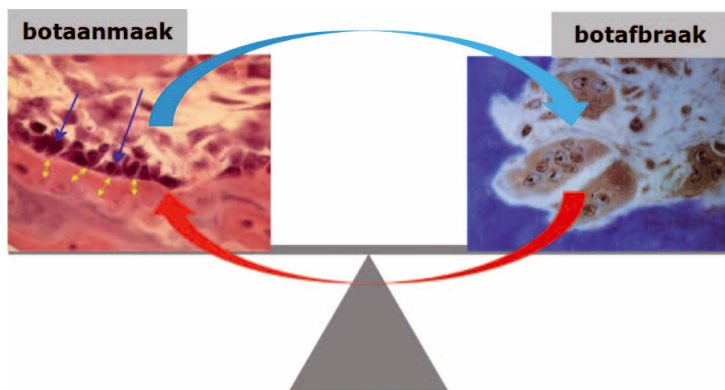
Bot is een zeer dynamisch weefsel dat continue wordt afgebroken en opgebouwd. Het wordt ververst door een gekoppelde afbraak en opbouw. In de groeifase is er meer vorming dan afbraak, in de volwassenfase zijn vorming en afbraak in balans en bij in ziekte zijn vorming en afbraak in onbalans. Naast hormonen speelt een veelvoud aan andere factoren hierbij een regulerende rol. Als gevolg van de stormachtige ontwikkelingen in de moleculaire biologie, analyse van transgene muismodellen, unieke klinische casus en beeldvormende technieken is in de afgelopen 20 jaar een explosie aan informatie over bot en botstofwisseling bekend geworden. Het blijkt dat veel factoren, zoals cytokines en groeifactoren, bekend van andere weefsels en cellen, ook effecten op de botstofwisseling hebben en dat er regulatoire factoren in de botmatrix opgeslagen liggen. De aanwezigheid van deze factoren hebben onder



anderen wij duidelijk aangetoond met behulp van antilichaam technieken. Twee zeer potente regulatoren van botcelgroei en -activiteit, “transforming growth factor-beta” en “insulin-like growth factor-I”, liggen in een inactieve vorm in de botmatrix opgeslagen<sup>10</sup>. Deze eiwitten kunnen tijdens het proces van botafbraak vrijkomen, geactiveerd worden en cellulaire functie reguleren<sup>11,12</sup>. Ook is gebleken dat factoren, zoals “bone morphogenetic proteins”, die in eerste instantie uit bot geïsoleerd zijn, niet alleen in bot maar ook in andere weefsels een rol spelen en bijvoorbeeld betrokken zijn bij de embryonale ontwikkeling. Het zal duidelijk zijn dat voor veel van deze factoren de oorspronkelijke naam de lading niet meer volledig dekt.

In bot kunnen er op basis van functie drie celtypen worden onderscheiden: 1) de osteoclast, 2) de osteoblast, en 3) de osteocyte. Zoals reeds eerder genoemd is de osteoclast afkomstig van de hematopoïetische stamcel. De osteoclast is een meerkernige cel die verantwoordelijk is voor de botafbraak. De osteoblast is afkomstig uit de mesenchymale stamcel en is verantwoordelijk voor de botvorming, synthese van de organische matrix en mineralisatie. De osteocyte ontstaat uit de osteoblast. De osteocyten zijn een eindstadium van de osteoblast differentiatie. Ze ontstaan door inbedding in de organische matrix tijdens de botvorming waar ze in een lacune blijven liggen nadat de matrix gemineraliseerd is. De osteocyten spelen een belangrijke rol in de regulatie van botstofwisseling met name in relatie tot mechanische belasting. Mechanische belasting is belangrijk voor een optimale botstofwisseling en sterk bot. Te weinig belasting, denk daarbij aan langdurig bedlegerige patienten of ruimtevaarders, leidt tot botmassa verlies. Extra belasting kan leiden tot een toename in botmassa, denk daarbij aan de dominante arm van professionele tennisspelers. Wat dit betreft is de beer in winterslaap een fascinerend experimenteel model voor bot- en spierziekten en voor veroudering<sup>13-15</sup>. Zwarte beren verliezen geen bot- en spiermassa bij jaarlijkse gelijke perioden van inactiviteit (winterslaap) en activiteit. Hoe kan de zwarte beer de bot- en spiersterkte op peil houden, terwijl er een 15-30% gewichtsverlies kan optreden? Onderzoek aan het intrigerende fenomeen winterslaap zou belangrijke informatie kunnen opleveren voor de menselijke fysiologie en pathofysiologie.

Voor een optimale botstofwisseling is een koppeling, of een balans tussen de werking van de osteoblasten/osteocyten en de werking van de osteoclasten cruciaal (Figuur 7). De huidige mechanistische kennis toont aan dat de osteoblasten een centrale rol spelen in de botstofwisseling en in de koppeling tussen botvorming en botafbraak. De osteoblasten zijn niet alleen verantwoordelijk voor de botvorming, maar regelen ook de vorming en activiteit van de osteoclast. Er is echter weinig bekend of de osteoclasten ook de activiteit van osteoblasten kunnen reguleren. Recent hebben we een model ontwikkeld waarbij we osteoblasten en osteoclasten samen kweken en daarin hebben we laten zien dat osteoclasten ook de activiteit van osteoblasten kunnen reguleren. Het ophelderen van de moleculaire basis van dit regulatiemechanisme is een belangrijk onderdeel van ons huidige onderzoek.

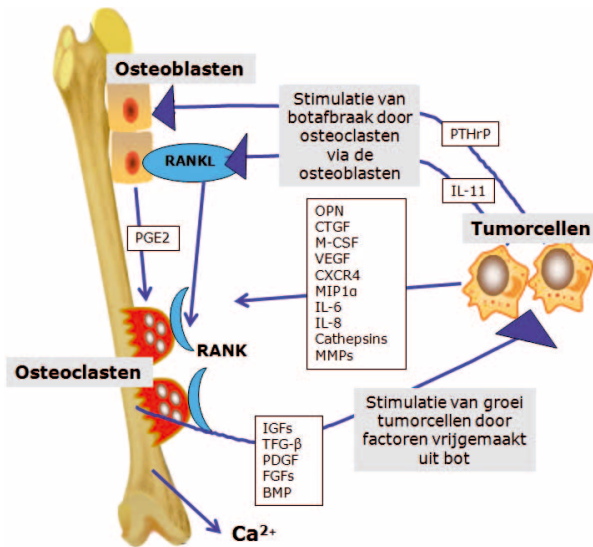


Figuur 7: Een gezond skelet vereist een balans van botaanmaak (osteoblasten in linker panel) en botaafbraak (osteoclasten, rechter panel). Blauwe pijlen in linker panel geven actieve, cuboïdale osteoblasten aan en gele pijlen geven osteoid aan. Osteoid is de net gesynthetiseerde en nog niet gemineraliseerde botmatrix.

Dit onderzoek laat zeer fraai zien dat er inderdaad een samenspraak is tussen deze twee celtypen en illustreert het belang van directe cel-cel communicatie voor het goed functioneren en het in balans zijn van een multicellulair organisme.

Bot is niet altijd hetzelfde en botstofwisseling is niet altijd in balans. Er is een grote variëteit aan botziekten waarbij de balans verstoord is. Dit zijn veelal monogenetische ziekten met een beperkte incidentie maar met grote effecten; bijvoorbeeld het reeds genoemde osteogenesis imperfecta. De primaire verstoringen kunnen liggen in de botaanmaak en in de botaafbraak, maar ook in de communicatie tussen de osteoblasten en osteoclasten zoals bij bepaalde vormen van osteopetrose<sup>16</sup>.

Er kunnen ook botproblemen optreden ten gevolge van een ziekte die primair een andere oorsprong heeft. Twee voorbeelden zijn reumatoïde artritis en kanker. Reumatoïde artritis wordt gekenmerkt door een ontregeld immuunsysteem en gewrichtsontstekingen. Er bestaat een interactie tussen cellen van het immuunsysteem en botcellen. Immuncellen produceren veel factoren, cytokines, die effecten hebben op botcellen en daarmee uiteindelijk op de botstructuur. Dit is ook het geval in reumatoïde artritis waarbij met name de osteoclasten bovenmatig geactiveerd zijn en er sterke botaafbraak kan optreden.

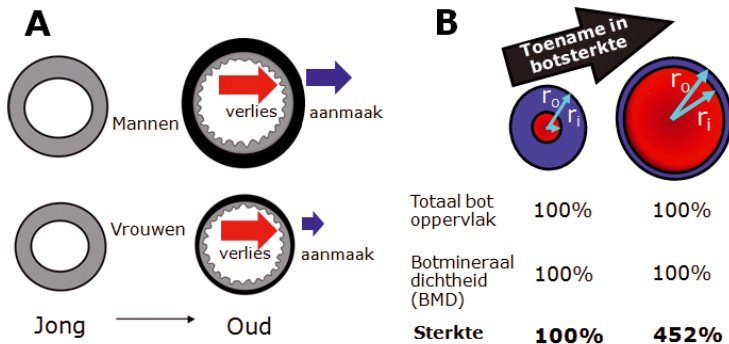


Figuur 8: Kwaadaardige cyclus ("vicious cycle") van tumorcellen en bot. Aangegeven zijn bioactieve factoren die de tumorcel produceert en die de botstofwisseling kunnen onregelen. Als reactie daarop kunnen er bioactieve factoren uit het bot vrijkomen die de groei van tumorcellen kunnen stimuleren. Bovendien kan er botontkalking als gevolg van toegenomen botresorptie optreden. Verschillende van deze bioactieve factoren zijn in afkorting, omkaderd, in de figuur weergegeven.

Samen met de Afdeling Reumatologie in het Erasmus MC doen we onderzoek naar de interactie tussen de immuuncellen en botcellen en analyseren of vitamine D hier een therapeutische rol bij kan spelen. Het tweede voorbeeld is kanker en dan met name de metastase van kankercellen naar bot. De botomgeving is zeer aantrekkelijk voor kankercellen om naar toe te gaan. Dit heeft waarschijnlijk te maken met hetgeen eerder beschreven is dat de botcellen veel bioactieve eiwitten zoals cytokines en groeifactoren maken en dat de organische botmatrix vol zit met bioactieve factoren<sup>17</sup>. Deze factoren hebben een chemotactisch, oftewel aantrekkend effect waardoor de kankercellen preferentieel in bot eindigen. De boteiwitten kunnen de groei van kankercellen stimuleren en de kankercellen maken factoren die de activiteit van botcellen onregelen. Op deze wijze is er als het ware een "vicious cycle" of kwaadaardige cyclus, ontstaan (Figuur 8). Het gevolg van deze processen is dat de balans tussen osteoblasten en osteoclasten verdwenen is. Metastase naar bot is een zeer ernstige complicatie bij kanker. Er is reeds inzicht verkregen in een aantal belangrijke processen. Veel onderzoek wordt hierbij gedaan met menselijke tumorcellen in diermodellen. Niet

alleen vanwege de verschillen tussen mens en dier heeft dit zijn beperkingen. In het kader van een recente onderzoekssubsidie proberen wij een volledig humaan *in vitro* botmetastase-model te ontwikkelen. Dit zal de mogelijkheid geven om het proces van de kanker-cel migratie en interactie tussen kanker-cel en bot-cel te bestuderen, maar ook interventies ter voorkoming van deze interactie te testen.

Gedurende het leven is bot en de botstofwisseling niet altijd in dezelfde balans en bot verandert sterk met de leeftijd. Tijdens veroudering worden de botstructuren dunner, of verdwijnen zelfs helemaal en het bot wordt zwakker. Osteoporose is een bekend en duidelijk voorbeeld van veranderingen in de botstofwisselingsbalans met veroudering. Het duidelijkst wordt dit in het geval van postmenopauzale osteoporose waarbij er door het wegvallen van de regelmatige productie van het vrouwelijke geslachtshormoon, oestradiol, een versnelde onbalans tussen botafbraak en botvorming ontstaat. Het is hierbij goed te realiseren dat osteoporose zich niet alleen beperkt tot vrouwen, maar dat het ook bij mannen kan optreden. Ongeveer één op de drie vrouwen en één op de acht mannen boven de 55 jaar krijgt osteoporose. Er zijn drie belangrijke redenen waarom de incidentie van osteoporose en de daarbij behorende fracturen bij mannen lager is dan bij vrouwen. Ten eerste: mannen missen het versnelde botmassa verlies dat vrouwen na de menopauze doormaken. Ten tweede: mannen worden minder oud dan vrouwen. Ten derde: mannen bouwen eerder in het leven een hogere botmassa op en ook de diameter van mannelijke botten is groter en daardoor zijn de botten sterker (Figuur 9A).

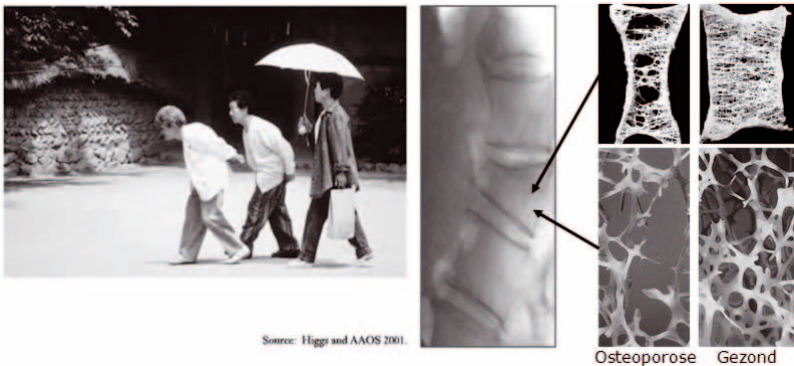


Figuur 9: A) Tijdens veroudering hebben mannen en vrouwen evenveel endostale resorptie maar de absolute perostale appositie is minder bij vrouwen dan bij mannen. B) Voorbeeld van de betekenis van periostale appositie. Een kleine toename aan de buitenzijde leidt bij een gelijkblijvende botmineraaldichtheid en een gelijkblijvend totaal botoppervlak tot een grote toename in sterkte van het bot.

Bovendien wordt bij mannen het botverlies aan de binnenzijde van het bot (=endostale resorptie) tijdens veroudering beter gecompenseerd door botvorming aan de buitenkant (=periostale appositie). Deze botgroei aan de buitenzijde van het bot is zeer belangrijk. Een kleine toevoeging van botmassa aan de buitenzijde leidt tot een zeer sterke toename in botsterkte (Figuur 9B).

Dit is een algemeen mechanisch principe en geldt bijvoorbeeld ook voor de buizen van van Leeuwen. In samenwerking met de afdeling Genetica van het Erasmus MC doen we onderzoek bij muizen met een verstoring in een van de eiwitten betrokken bij het transcriptie-gekoppelde DNA-schade herstelmecanisme. Het blijkt dat deze muizen na een normale ontwikkeling vanaf zes maanden een versnelde botveroudering doormaken en ongeveer 40 weken eerder dan de controle muizen een afname in botstructuur en botsterkte laten zien. Het blijkt dat met name de periostale appositie, ter compensatie van de endostale resorptie, is verstoord. Dit biedt de mogelijkheid om de mechanismen van de periostale appositie te onderzoeken en daarmee het proces te gaan beïnvloeden. Op dit moment wordt op stamcelniveau bestudeerd of er tijdens veroudering een onbalans is in de vorming van osteoblasten en osteoclasten en of biomerkers en therapeutische doelen hiervoor geïdentificeerd kunnen worden.

Osteoporose, letterlijk poreus bot, wordt door de Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) gedefinieerd als een systemische skeletziekte. Deze wordt gekarakteriseerd door een lage botmassa en een verstoring van de microarchitectuur van het botweefsel met als gevolg een toename in botfragiliteit en gevoeligheid voor fracturen (Figuur 10).



Figuur 10: Een onbalans tussen botvorming en botafbraak maakt het bot zwakker: het zal buigen en uiteindelijk barsten (breken). In het rechter panel is de trabeculaire structuur van een gezonde en een osteoporotische wervel te zien. In het midden panel een klassieke wig-vormige wervelinzakking of wervelfractuur. Aan de linkerzijde drie vrouwen die in toenemende mate een buiging van de wervelkolom (kyphosis) tonen als gevolg van osteoporotische fracturen van de wervelkolom.

De criteria voor osteoporose zijn gebaseerd op het meten van de botmineraaldichtheid (BMD). Wanneer de BMD 2.5 standaarddeviatie lager is dan de gemiddelde BMD van gezonde jonge caucasische vrouwen rond de leeftijd van 25 jaar dan is de diagnose osteoporose. Dit is een zogenaamde T-score van -2.5. De volgende groepen zijn gedefinieerd: T-score hoger dan -1 is normaal bot; T-score tussen -1 en -2.5 is osteopenie, en T-score lager dan -2.5 en een niet-traumatische fractuur is ernstige osteoporose. De WHO heeft niet voldoende data om zulke criteria te definiëren specifiek voor mannen of andere etnische groepen. Dit betekent gezien de verschillen tussen mannen en vrouwen en tussen rassen, een grote beperking en verdient verbetering. Het is echter zeer de vraag of we ons hierbij dan alleen op de BMD moeten richten. Hoewel BMD op dit moment veel gemeten wordt en zeker een indicatie kan geven, moet men zich realiseren dat BMD geen absolute risico determinant is. Analyses van onze eigen onderzoeksgroep toonden aan dat de meeste fracturen optreden in de groep die niet aan de BMD osteoporose criteria voldoen. De meeste fracturen treden op in de groep patiënten die volgens de definitie geen osteoporose hebben<sup>18</sup>. Osteoporose wordt vaak botontkalking genoemd. Het is echter een foutieve veronderstelling dat osteoporose alleen een afname in het mineraalgehalte is. Ook de afname van en veranderingen in de organische matrix en in de cellulaire activiteit spelen een belangrijke rol. Hiervoor bestaan echter nog geen duidelijke diagnostische indicatoren. Osteoporose is geen mineralisatiestoornis, maar wordt gekenmerkt door een afname van de totale botmassa en daardoor een afname in botkwaliteit met als gevolg dat het bot bij onbalans minder goed kan reageren en eerder zal barsten. We moeten dus spreken over botarmoede in plaats van botontkalking.

In tegenstelling tot de eerder genoemde monogenetische botziekten met lage incidentie is osteoporose een belangrijke volksziekte. Osteoporotische fracturen hebben een grote impact op de kwaliteit van leven als gevolg van afgenomen mobiliteit, een toegenomen afhankelijkheid, onzekerheid en vaak chronische pijn. Het legt ook een grote druk op het budget voor de gezondheidszorg. In Europa werd in 2000 het aantal osteoporotische fracturen geschat op 3.8 miljoen waarvan 900.000 heupfracturen. De directe kosten die hiermee gemoeid zijn worden geschat op 32 miljard Euro. Op basis van de huidige demografische gegevens is de verwachting dat dit voor Europa alleen zal stijgen tot bijna 80 miljard Euro in 2050<sup>19,20</sup>.

Het is zowel vanuit individueel oogpunt van de patient als vanuit het oogpunt van het gezondheidszorgbudget van zeer groot belang om over betrouwbare risicofactoren voor osteoporose en over effectieve preventieve en interventie strategieën te beschikken. Preventie begint al in de jeugd tijdens de groei en de opbouw tot de piek botmassa met adequate calciuminname en vitamine D voorziening, regelmatig sporten en geen overmatig alcohol gebruik en niet roken. Voor volwassenen gelden eigenlijk dezelfde preventieve maatregelen waarbij met name het blijven gebruiken van de spieren door te blijven bewegen en sporten en voldoende voeding (zie hierboven paragraaf over calcium homeostase) zeer belangrijk zijn.

Er zijn een groot aantal risicofactoren voor osteoporose te identificeren zoals in deze dia is te zien. (Tabel 1)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eigen fractuur geschiedenis</li> <li>• Lage botmineraaldichtheid (BMD)</li> <li>• Hogere leeftijd</li> <li>• Vrouwelijk geslacht</li> <li>• Familiare fractuurgeschiedenis</li> <li>• Laag lichaamsgewicht (&lt; 60 kg)</li> <li>• Ernstige immobiliteit</li> <li>• Vitamine D-deficiëntie</li> <li>• Lage calcium inname (&lt; 500 mg/dag)</li> <li>• Vroege menopauze</li> <li>• Roken</li> </ul>	<p><b>Medicijngebruik</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Langdurig corticoïsteroïd gebruik</li> <li>• Anti-epileptica</li> <li>• Langwerkende benzodiazepinen</li> </ul> <hr/> <p><b>Verskillende pathologiën</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inflammatoire darmziekten</li> <li>• Hypogonadisme</li> <li>• Malabsorptie</li> <li>• Primaire hyperparatheroïdie</li> <li>• Syndroom van Cushing</li> <li>• Reumatoïde artritis</li> <li>• Anorexia nervosa</li> <li>• Hyperthyreoïdie</li> </ul>
--	---

Tabel 1: Risicofactoren voor osteoporose.

Dit zijn voornamelijk “indirecte” risicofactoren. Behalve de BMD en de fractuurgeschiedenis zit er geen enkele factor bij die direct iets aangeeft over de staat van het bot en de risicofactoren zijn verre van waterdicht. Zo kan bijvoorbeeld langdurig corticosteroid gebruik bij de ene patiënt wel en bij de andere niet tot osteoporose leiden. Er is behoefte aan nieuwe en betere determinanten voor het risico op osteoporose en bij voorkeur risicofactoren die iets zeggen over de conditie van het bot (kwaliteit organische matrix en cellulaire activiteit) en de ontwikkeling van de botstofwisseling in de toekomst. Dit laatste is met name heel erg belangrijk in verband met de zogenaamde “compliance”, dat wil zeggen therapie-trouw. In het geval van diabetes mellitus is de motivatie om insuline te spuiten zeer groot. Zodra dit niet wordt gedaan, ervaart de patient direct de nadelige gevolgen. Bij osteoporose kunnen de echte grote problemen, fracturen, pas na vele jaren, soms 10-20 jaar, optreden. Het zal dan ook duidelijk zijn dat de motivatie om medicijnen in te nemen zeer groot moet zijn en dit zal het grootst zijn wanneer de kans op het krijgen van fracturen zo nauwkeurig mogelijk voorspeld wordt.

Voor het onderzoek naar nieuwe risicodeterminanten en therapeutische doelen is het van groot belang te realiseren dat osteoporose een complexe ziekte of wel een systeem-ziekte is. Daarmee wordt bedoeld dat niet één factor, zoals bijvoorbeeld een mutatie in een enkel gen (denk aan osteogenesis imperfecta), maar een veelvoud aan variaties in genetische informatie en omgevingsfactoren betrokken zijn bij het ontstaan

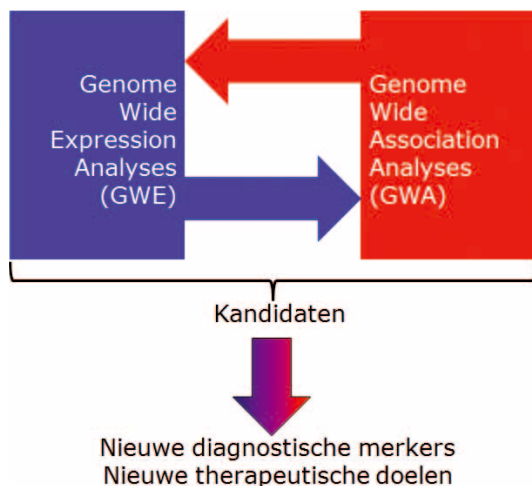
van osteoporose. Dit betekent dat osteoporose niet benaderd moet worden door te zoeken naar een enkele risicofactor, of een enkel therapeutisch doel. Het moet benaderd worden op een systeem-biologische manier waarbij een veelvoud aan factoren in samenhang geanalyseerd moeten worden. Om dit te kunnen bereiken is een optimaal inzicht in de mechanismen van botstofwisseling, impact van omgevingsfactoren en de etiologie van osteoporose vereist.

### **Epidemiologische analyses**

**H**et epidemiologisch onderzoek heeft nieuwe inzichten, nieuwe hypothesen en aanzetten voor verder onderzoek gegeven. Bijvoorbeeld het onderzoek zoals eerder genoemd over de dissociatie tussen de WHO-definitie van osteoporose en fractures. Daarnaast maakt sinds 1993 genetisch epidemiologisch onderzoek een belangrijk onderdeel van ons onderzoek uit. Nadat ik, nog zonder volledig de mogelijkheden en onmogelijkheden te kunnen overzien, een succesvolle subsidieaanvraag bij het toenmalig Preventiefonds had ingediend, kon het genetisch onderzoek naar osteoporose een volle aanvang nemen. Het genetisch onderzoek in samenwerking met de afdeling Epidemiologie en Biostatistiek is gezien de publicaties en de vervolgens verkregen subsidies zeer succesvol geweest en is nog steeds zeer succesvol. Het moet echter ook worden vastgesteld dat het succes wat betreft het toevoegen van nieuwe direct klinisch te gebruiken osteoporose risicofactoren vooralsnog afwezig is. Toch is er al een groeiend aantal bedrijven dat voor letterlijke non-informatie over het risico op complexe volksziekten u forse bedragen uit de zak wil kloppen voor allerlei genetische testen.

Een belangrijke oorzaak voor het gebrek aan het vinden van echt nieuwe klinische merkers is de combinatie van, ten eerste: het feit dat zoals eerder uitgelegd osteoporose een complexe systeem-ziekte is waarbij variaties in meerdere genen elk slechts een klein deel bijdragen aan het ontstaan van het uiteindelijke ziektebeeld en ten tweede: analyse technische beperkingen om variaties in meerdere genen tegelijk te analyseren. Veel wordt op dit moment verwacht van de Genoom Wijde Associatie (GWA) studies. Hierbij kunnen een half miljoen tot een miljoen genetische variaties tegelijkertijd in relatie tot bijvoorbeeld fractures geanalyseerd kunnen gaan worden. Dit gaat een zeer grote hoeveelheid gegevens opleveren waaruit nieuwe risicodeterminanten geïdentificeerd moeten gaan worden. Wat betreft de selectie van risicokandidaten en functionele analyses kunnen wij een belangrijk stap zetten door een slimme koppeling te maken tussen de GWA data en de reeds door ons verkregen Genoom Wijde Expressie (GWE) gegevens (Figuur 11). Hopelijk kunnen we op deze manier wel de nieuwe klinisch risicodeterminanten gaan leveren. Het genetisch epidemiologisch onderzoek heeft grote stappen voorwaarts kunnen maken door spectaculaire technische ontwikkelingen. Deze technische ontwikkelingen doen zich nu ook voor wat betreft het onderzoek naar de producten van deze genen, de eiwitten.



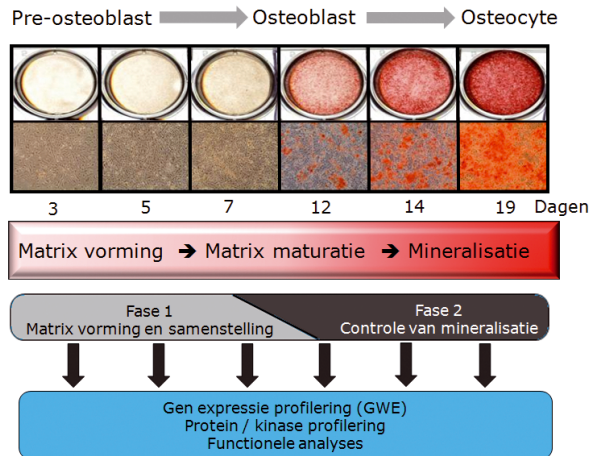


Figuur 11: Schema van de combinatie van genoom wijde expressie (GWE) in interactie met genoom wijde associatie (GWA) studies om te komen tot de identificatie van nieuwe diagnostische en therapeutische doelen.

Op dit moment proberen we eiwitprofielen te maken van vrouwen met en vrouwen zonder fractures. Als achterliggend doel om ook daarin specifieke merkers te identificeren die als risicodeterminant kunnen dienen. Het genetisch onderzoek beperkt zich niet tot osteoporose, maar hierbij wordt ook osteoartrrose bestudeerd. Osteoartrrose, gekenmerkt door kraakbeenverlies en ectopische botvorming, is naast osteoporose wat betreft incidentie de belangrijkste ziekte van het bewegingsapparaat. Het wordt ook gekenmerkt door een sterke toename tijdens veroudering. Wat betreft incidentie lijken osteoporose en osteoartrrose elkaar min of meer uit te sluiten, maar er lijken ook koppelingen te bestaan tussen bot en kraakbeen en mechanismen van ontstaan. In samenwerking met de afdeling Orthopedie van het Erasmus MC wordt dierexperimenteel onderzoek gedaan naar de relatie tussen botmassa, botstructuur, oestradiol status en het ontstaan van osteoartrrose-achtige veranderingen in het gewricht. Dit zal hopelijk meer inzicht verschaffen in de interactie tussen deze twee skeletcompartimenten en het ontstaan van deze ziekten. Deze combinatie van onderzoek naar osteoporose en osteoartrrose is mijns inziens een voorbeeld van hoe het onderzoek naar veroudering moet plaats vinden. De “one disorder at a time” aanpak heeft beperkte kracht om het proces van veroudering te onderzoeken en mechanismen te ontdekken om daarmee “tools” te vinden die kunnen bijdragen aan gezond ouder worden<sup>21</sup>. Een gecombineerde aanpak heeft veel meer kracht en zal kunnen leiden tot het ontdekken van gemeenschappelijke thema’s. Wij werken vanuit deze visie en onze kennis van calcium homeostase en skeletziekten.

## Cel- en moleculair biologische analyses

De huidige therapieën voor osteoporose zoals bisfosfonaten en estradiol, of estradiol-gerelateerde stoffen, zijn gericht op het remmen van de botafbraak en daarmee progressie van osteoporose. Behandeling vindt pas plaats op het moment dat botverlies heeft plaatsgevonden en de gevolgen van osteoporose duidelijk worden. Er is een grote behoefte aan anabole therapieën. Dit zijn behandelingen die de botvorming stimuleren. Wij proberen hieraan bij te dragen op basis van onderzoek aan humane *in vitro* botvormingsmodellen. Osteoblasten doorlopen een nauwkeurig geprogrammeerd ontwikkelingsprogramma van mesenchymale stamcel, pre-osteoblast naar osteoblast en uiteindelijk osteocyte. Ze doorlopen een programma waarbij er periodes van proliferatie, differentiatie en botmatrix vorming is, gevolgd door matrix maturatie, zodat deze klaar is om gemineraliseerd te worden (Figuur 12).

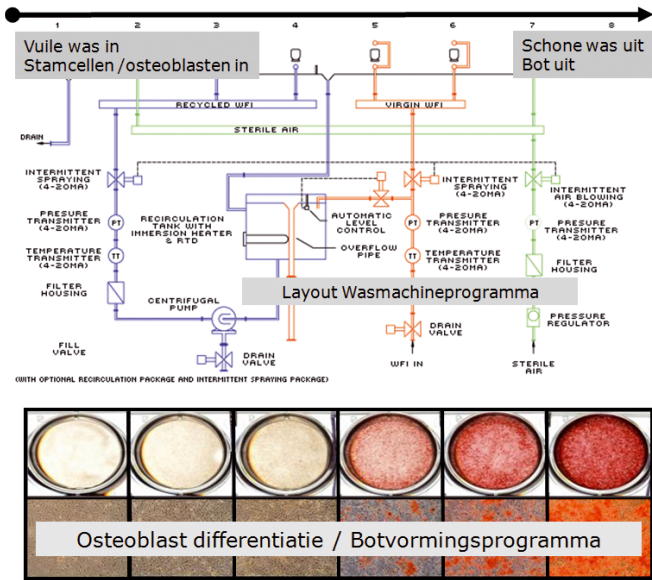


Figuur 12: In vitro botvormingsmodel gebaseerd op het kweken van humane osteoblasten. In een periode van 3 weken ontwikkelen deze zich van pre-osteoblast tot osteoblast en uiteindelijk osteocyte. In deze periode produceren de osteoblasten vele eiwitten die samen de extracellulaire botmatrix vormen die uiteindelijk gemineraliseerd wordt. Tijdens deze osteoblast differentiatie en botvorming worden op verschillende tijden de gen en eiwit expressie en kinase activiteit gemeten en de functie van geïdentificeerde genen in de botvorming en mineralisatie onderzocht.

De rode kleur in het bovenste panel van figuur 12 toont de mineralisatie aan. Verschillende functionele fases kunnen worden onderscheiden. Het is een zeer strak georganiseerd programma waarbij net als bij een wasmachineprogramma alles in de juiste volgorde, op het juiste moment en in de juiste mate moet gebeuren. Ter illustratie, als eerst de hoofdwasscyclus gestart wordt en daarna pas het water wordt toegevoegd dan zal

de wasmachine niet goed werken en de was niet goed worden gedaan. Wij onderzoeken nu door middel van GWE, eiwitexpressie analyses en functionele karakteristatie de factoren die dit osteoblastdifferentiatieprogramma bepalen. De GWE informatie zal gekoppeld worden aan de genetische GWA gegevens ter selectie en identificatie van osteoporose risicofactoren (Figuur 11).

Tot nu toe is er in het onderzoek naar osteoblast differentiatie met name aandacht besteed aan het bestuderen van onafhankelijke factoren, maar zoals genoemd is osteoporose een complexe ziekte en bestaan er regelmechanismen van een hogere orde. Factoren zullen dus niet onafhankelijk werken, maar in interactie met elkaar, in netwerken. Factoren kunnen samenwerken, maar ook elkaar tegenwerken. In samenwerking met de afdelingen Moleculaire Celphysiologie van de Vrije Universiteit in Amsterdam en het Manchester Centre for Integrative Systems Biology in Manchester Groot Brittanie proberen we mathematische regulatorie modellen van het osteoblast differentiatieprogramma te ontwikkelen. Zodat we, vergelijkbaar aan een relatief simpel wasmachineprogramma met terugkoppelingen en voortgangscntrolepunten, een osteoblast differentiatie/botvormingsprogramma kunnen opstellen (Figuur 13).



Figuur 13: De analogie tussen een wasmachineprogramma en het te beschrijven osteoblastdifferentiatie en botvormingsprogramma dat bepaalt en controleert dat alle stappen op het juiste moment en in de juiste mate worden uitgevoerd, zodat er aan het einde een schone was is ofwel een optimale gemineraliseerde botmatrix.

Wanneer op deze wijze de cruciale punten in het regulatieprogramma geïdentificeerd kunnen worden, dan zijn dit ook aangrijpingspunten om in te grijpen en de botvorming te stimuleren dan wel te remmen. De osteoblast is net als de spiercellen, vetcellen en kraakbeencellen afkomstig uit de mesenchymale stamcel. In een vergelijkbare aanpak onderzoeken we de differentiatie van mesenchymale stamcellen. De moleculaire kennis uit deze studies kan dan ook van grote waarde zijn bij het begrijpen en robuust reguleren van stamceldifferentiatie en uiteindelijk bijdragen aan “weefsel engineering” en aan regeneratieve geneeskunde.

Een laatste voorbeeld van de cel en moleculair biologische analyses betreft onze recente bevinding dat de factoren activine A en follistatin de osteoblast differentiatie, matrix vorming en de uiteindelijke mineralisatie reguleren. De verhouding van activine A en follistatine kan een merker en een behandeling zijn voor niet alleen botproblemen, zoals osteoporose maar mogelijk ook andere, pathologische, verkalkingen zoals aderverkalking. We toonden aan dat activine A en follistatine ook in een model voor aderverkalking matrixvorming en mineralisatie reguleert<sup>22</sup>. Processen tijdens botvorming en aderverkalking vertonen veel overeenkomsten. Deze ontdekking en het ontrafelen van de mechanismen daarachter openen ook mogelijkheden om nieuwe interventies te bedenken en te ontwikkelen.

Het mag duidelijk zijn dat voor het goed verlopen van al de beschreven processen het cruciaal is dat op de juiste plaats, op het juiste moment de juiste actie plaats vindt. Als hierin iets niet klopt bijvoorbeeld door een foutieve of foutief getimede interactie met de omgeving, dan gaat het mis. Dit sluit weer aan bij het begin van mijn rede.

### Onderwijs:

**T**ot slot wil ik kort nog iets zeggen over het onderwijs binnen de Geneeskunde-opleiding en voor zover ik dat kan in relatie tot het onderwijs in Nederland. Als coördinator van het Keuzeonderwijs en Keuzeonderzoek van de afdeling Inwendige Geneeskunde krijg ik, in de onderwijsprogramma's die we hebben te maken met studenten die zelf een casus, of onderwerp moeten onderzoeken en uitwerken.. Zij moeten bijvoorbeeld de diagnose gaan stellen en de achtergronden van de ziekte achterhalen. Zij moeten de vragen gaan beantwoorden: Waar is het mis gegaan? Welk principe is de huidige behandeling gebaseerd? Wat zijn de nadelen van deze behandelingen? Waar zijn openingen voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën? Het is iedere keer weer goed om te zien hoe de studenten in korte tijd een zeer goede presentatie over de casus samenstellen en ook kunnen presenteren. Ik heb echter soms het idee dat de basiskennis, gewoon een brede feitenkennis, tekort schiet, en met name kennis over interacties tussen processen. Wat betreft brede basiskennis zie ik in mijn directe omgeving dat dit ook steeds meer in het basisonderwijs en op de middelbare school achterblijft. Ook daar is heel veel projectjes doen, opzoeken, googelen en Powerpoint-presentaties maken zeer belangrijk. Dat verklaart wel waarom

de studenten dit onderdeel zo goed beheersen. De kennis is vaak beperkt tot de casus die men heeft moeten uitzoeken, maar kennis over de plaats in het grotere geheel of interactie met andere processen is nog vaak afwezig. Dit is juist van belang om ziekten en de implicaties daarvan in bredere zin optimaal te kunnen begrijpen. Dit gebrek kan natuurlijk aan de opleiding liggen waarbij we ons misschien meer moeten richten op systeemleren: Het leren integreren van gegevens, vergelijkbaar aan de systeembiologieaanpak voor het onderzoek dat ik eerder heb beschreven. Dit is mijns inziens een belangrijk punt van aandacht voor de opleiding en is zeker één van de uitdagingen om binnen ons keuzeonderwijs en -onderzoeksprogramma's te gaan realiseren.

### **Onderzoeksattitude- onderzoeksklimaat**

**I**k ben zeer blij om te zien dat van een kleine club met 1.5 analist, één onderzoeker en één arts-onderzoeker de groep is gegroeid tot de huidige, grote enthousiaste onderzoeksgroep. Ik weet niet wat hier het precieze recept voor is geweest, maar ik weet wel dat er een houding aan ten grondslag ligt van niet bang zijn voor veranderingen en nieuwe ontwikkelingen als uitdagingen zien. Dit zijn zeer belangrijke eigenschappen voor een onderzoeker. Men moet een zeer grote nieuwsgierigheid hebben en, heel belangrijk, de eigenschap van het primair zien van mogelijkheden in plaats van onmogelijkheden. Nieuwe ontwikkelingen moeten als uitdagingen en niet als een bedreiging van het bestaande gezien worden. Een voorbeeld hiervan is het GRID computingproject van enkele jaren geleden samen met de RABObank en IBM. Een onderzoeker moet de drang hebben om over het "hek" van zijn/haar eigen onderzoeksterrein te kijken en de kennis daarbij opgedaan te integreren in het eigen onderzoek. Dit zijn aspecten die zeer belangrijk zijn om in onderzoek vernieuwend te zijn, nieuwe samenwerkingen te initiëren en stappen voorwaarts te maken. Blijf vragen stellen. Wees niet bang om vragen te stellen! Daardoor daag je elkaar uit en kom je vooruit. Hierbij is het wel van belang dat kritische, uitdagende vragen niet persoonlijk bedoeld zijn en ook niet persoonlijk worden opgevat, maar er alleen op gericht zijn om dat ene baanbrekende experiment te bedenken en het onderzoek vooruit te brengen.

Eigenlijk voor alles, maar zeker ook voor onderzoek is het uitermate belangrijk dat je creatief leert denken en creatief blijft denken. Vaak zit men binnen zijn/haar natuurlijke denksystemen gevangen in clichés. Men moet proberen die clichés terug te dringen en proberen buiten de gebaande paden te denken. Creativiteit is het produceren van toegevoegde waarde. Opmerkelijk is dat oorspronkelijk denkvermogen vaak geen criterium is bij de werving van personeel.

Ik wil ook het gebrek aan perspectief en structurele posities binnen het Nederlandse onderzoeksklimaat benoemen. Er zijn weinig plekken beschikbaar en die zijn al helemaal niet beschikbaar voor goede onderzoekers die niet direct zelf leider van een onderzoeksgroep willen of kunnen worden. Zij nemen wel echter een zeer cruciale en centrale positie in een onderzoeksgroep in en zijn van groot belang zijn voor het succes

van de onderzoeksgroep. Deze groep van zeer waardevolle onderzoekers moeten hopen dat ze van het ene kortlopende project naar het andere kortlopende project kunnen overstappen. Daarbij komt dan nog dat de universiteit deze medewerkers na vijf jaar in vaste dienst moet nemen. Dit kan een goede regel zijn voor deze waardevolle onderzoekers. Er zijn echter geen posities beschikbaar. Dit betekent dat deze belangrijke onderzoekers moeten vertrekken en voor het onderzoeksprogramma verloren gaan, of zelfs helemaal teleurgesteld het onderzoek verlaten. Dit impliceert een groot expertiseverlies en kapitaalvernietiging. Toen ik mijn rede al klaar had kreeg ik afgelopen week de nieuwe Scanner in handen waarin ik veel kon lezen over Perspectief 2008 betreffende het personeelsbeleid van het Erasmus MC. Heel veel mooie doelen worden beschreven o.a. over stimuleren van creativiteit en veilige werkomgeving etc.. Er staan ook opmerkingen in over talent en behoud van personeel, maar ik heb niets kunnen terugvinden dat men zich bewust is van de problemen van deze groep waardevolle medewerkers, die met hun onderzoek meebouwen aan een succesvol Erasmus MC. Hopelijk wordt er in de toekomst ook aan deze groep gedacht en wordt er ook kritisch gekeken naar het in stand houden van de vijf-jaars regel.

In relatie hiermee, een recent voorbeeld uit eigen ervaring met een NWO subsidie. Wij hadden een zeer succesvol programma samen met de afdeling Celfysiologie van de Radboud Universiteit in Nijmegen, met meerdere hoog scorende publicaties. Na vier jaar is het afgelopen en moet een onderzoek en samenwerking die bewezen hebben succesvol te zijn en boven de standaard te functioneren stoppen. We mochten zelfs geen vervolgsubsidieaanvraag indienen, omdat we al een subsidie hebben gehad. Waarom niet een systeem waarbij voor een goed projectvoorstel voor vier of vijf jaar geld beschikbaar wordt gesteld? Je krijgt dan de kans om de waarde van dit project te bewijzen. Is het niet succesvol, dan is het logisch dat het gestopt wordt. Indien je echter hebt bewezen dat het succesvol is, dan is er na het indienen van een nieuwe aanvraag voor de komende periode een grote kans dat je door kan gaan. Indien dit zo zou werken, dan is er ook, gekoppeld aan de prestatie, voor de eerder genoemde waardevolle onderzoekers van een onderzoeksgroep een veel beter perspectief naar de toekomst.

Voor het hierboven geschetste zijn mijns inziens wel oplossingen en verbeteringen te bedenken. Deze zouden niet eens primair opgelost hoeven te worden via de directe eerste geldstroomgelden van de universiteit. Het zou geregeld kunnen worden via een herstructurering van de verdeling van subsidiegelden van de Nederlands Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), Economische Zaken, en andere initiatieven van de overheid zoals het gebruik van de aardgasbaten. De huidige verdeling van de aardgasgelden en andere gelden voor innovatie initiatieven is vrij ondoorzichtig en de gelden komen vaak niet terecht bij de beste onderzoeksprojecten, maar bij de groepen die het beste zijn in het lobbyen. Misschien dat dit nu gaat veranderen met de nieuwe minister van Onderwijs Cultuur en Wetenschappen die afkomstig is uit de onderzoekswereld. Op 14 juli 2006 schrijft hij in zijn column in de Volkskrant dat: "Balkendes ondoorzichtige publiek-private programma's brengen

het geld naar de onderzoekers die het drukst zijn met vergaderen, niet naar de beste wetenschap". Hopelijk kan hij hier veranderingen in aanbrengen. Mijn voorstel is: breng alle overheidsgelden voor onderzoek: van basaal tot toegepast onderzoek en de commerciële exploitatie daarvan onder bij een nieuw instituut of raad voor Nederlandse Wetenschappelijk Onderzoek, een soort Dutch Research Council. Deze raad zou een combinatie moeten zijn van de huidige NWO, Stichting Toegepaste Wetenschappen en Senter, en mogelijk andere instituten. De gelden moeten dan op een eenduidige transparante wijze verdeeld worden via een uniform peer-review systeem. Laten we hopen dat er inderdaad veranderingen gaan komen in de wijze van verdeling van alle gelden die beschikbaar komen voor onderzoek. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de subsidies op Europees niveau, maar tegenwoordig ook in Nederland door de aardgasgelden en innovatie-initiatieven veelal megalomane onderzoeksprogramma's moeten zijn. Management is hierbij bijna belangrijker dan de inhoud van het onderzoeksprogramma. Er is bijna geen kans voor kleinere, twee of drie groepen efficiënte onderzoeksprojecten. Gelukkig is er dit jaar op Europees niveau voor het eerst, door jarenlange initiatieven van het Initiative for Science in Europe, de European Research Council ingesteld waarbij de onderzoeksprojecten bepaald worden door de onderzoekers en niet door de politiek.

## Samenvattend

Het onderzoek van de leerstoel Calcium- en Botstofwisseling richt zich op een beter begrip van de skelet- en de calciumhomeostase en het ontstaan en progressie van ziekten binnen dit veld, in het bijzonder tijdens veroudering.

Het uiteindelijke doel van het calcium-en botstofwisselingsonderzoek is om door middel van een combinatie van moleculair, celbiologisch, dierexperimenteel, epidemiologisch en klinisch onderzoek te komen tot een verbeterde diagnostiek en behandeling van skeletziekten en verstoringen in de calciumstofwisseling.

Op dit moment kunnen drie geïntegreerde onderzoeklijnen worden onderscheiden. Ten eerste: fysiologie, genetica en epidemiologie van calcium- en skeletstofwisseling. Ten tweede: de impact van nutriënten en nutriënten-gerelateerde regulatiemechanismen op de botstofwisseling. Ten derde: moleculaire en functionele karakterisatie van mesenchymale stamcel- en botcelontwikkeling in relatie tot matrix vorming, mineralisatie en botafbraak met specifieke aandacht voor cel-cel communicatie.

Het onderwijs moet zich richten op het leren integreren van kennis zodat fysiologische processen en ziekten in interactie met elkaar bekeken worden. Denkt u hierbij bijvoorbeeld aan de lijst met osteoporose risico factoren zoals getoond in Tabel 1.

Het is vandaag 1 juni 2007 precies 40 jaar geleden dat Sergeant Pepper's Lonely Hearts Club Band van The Beatles uitkwam. Laten we hopen dat mijn leerstoel net zo'n succes gaat worden.





## Dankwoord

Tot slot wil ik de Raad van Bestuur, het College van Bestuur en de Vereniging Trustfonds Erasmus Universiteit hartelijk danken voor het instellen van deze leerstoel en het in mij gestelde vertrouwen.

Het mag al wel duidelijk zijn uit mijn rede dat je onderzoek niet alleen doet, maar dat het een teamprestatie is. Ik wil hierbij dan ook het huidige onderzoeksteam enorm hartelijk bedanken. Ook wil ik de medewerkers die in het verleden hun bijdrage hebben geleverd en zeker belangrijke bouwstenen voor de huidige onderzoekslijnen hebben aangedragen hier bij betrekken. Met name André Uitterlinden wil ik bedanken voor alle inspanningen om het genetisch osteoporose-initiatief uit 1993 te laten uitgroeien en het heeft nu ook een bredere invloed op andere onderzoekslijnen binnen de afdeling Inwendige Geneeskunde en het Erasmus MC gekregen. Er heeft zich een succesvolle samenwerking ontwikkeld. Ik hoop van harte dat we deze unieke en sterke complementaire combinatie in de toekomst kunnen voorzetten.

Verder wil ik ook alle onderzoekers en onderzoeksgroepen binnen het Erasmus MC bedanken met wie ik heb mogen samenwerken en nog samenwerk. Met name: Harrie Weinans en Gerjo van Osch van de afdeling Orthopedie, Jan Hoeijmakers en Bert van der Horst van afdeling Genetica, Peter van der Spek en Sigrid Swagemakers van de afdeling Bioinformatica, en Edgar Colin en Eric Lubberts van de afdeling Reumatologie

De samenwerking met Rene Bindels en Joost Hoenderop van het Radboud Universitair Medisch Centrum is er één, die ik iedereen wil toewensen. Ik hoop dat we de kans krijgen om de in komende jaren samen nog veel mooie dingen te doen. Als ik kijk naar wat er op stapel staat, zal dat zeker wel het geval zijn. Hans Westerhoff en zijn team uit Amsterdam; bedankt voor het omarmen van de ideeën die wij hadden over ons botcelmodel en systeembioïologie en de wijze waarop we samen proberen daar invulling aan te geven.

Anna Teti en Stuart Ralston wil ik bedanken voor de spannende en leuke jaren die we samen hebben gehad waarin we van een zieldogende European Calcified Tissue Society een zeer gezonde en florerende vereniging hebben gemaakt. Dit kan het best worden geïllustreerd door de 3300 deelnemers aan ons jaarlijkse congres in mei 2007 in Kopenhagen.

Ik wil ook Jan Birkenhager memoreren. Hij heeft het mogelijk gemaakt om mij vanuit Leiden aan te trekken. Ik wil hem hierbij herinneren om zijn “open mind”, stimulerende houding bij alle plannen en activiteiten die ik had en ook de vrijheid die ik kreeg om deze inderdaad te ontplooien.

Ik wil hem ook bedanken voor het vertrouwen in zijn scout, Huib Pols, die mij reeds zes maanden na het begin van mijn promotieonderzoek in Leiden spotte bij een nachtelijk onderzoek tijdens een congres in Angers, Frankrijk. Beste Huib, ik wil je bedanken voor alle jaren van onze samenwerking. Het was fantastisch, is fantastisch en ik hoop dat we dit nog lang zo mogen voortzetten. Tijdens jouw oratie heb je ook gerefereerd aan onze samenwerking waarbij de klinische en basale expertise samen komen. Ik vind dat onze samenwerking eigenlijk een voorbeeld is voor hoe onderzoek

en patiëntenzorg in een academisch medisch centrum samen moet gaan.

Bio Bacchus. Wij hebben elkaar in de eerste week van de introductie aan de universiteit ontmoet. Daarna is de club alleen maar groter geworden met meer vrienden en vriendinnen. We hebben na 30 jaar nog steeds nauw contact. Dit is uniek en voor mij zeer kostbaar. Ik denk dat we het toonbeeld waren van heel veel plezier en lachen en tegelijkertijd toewijding en waarschijnlijk toch ook nog wel wat kwaliteit. Dit laatste mag blijken uit het feit dat er nu drie van de groep reeds professor zijn en anderen vooraanstaande posities hebben verworven.

Er zijn twee mensen die ik wat graag hierbij had willen hebben, maar die ik helaas al veel te lang moet missen. Ik wil ze bedanken voor alle vrijheid die ze mij hebben gegeven. Ze zullen misschien best wel eens hun twijfels hebben gehad, maar ze hadden dan nu kunnen zien dat het allemaal best wel redelijk is gelopen met die snuiter.

Ella, Guido en Marieke. Het is fantastisch om jullie vader te zijn en jullie te zien opgroeien en ontwikkelen tot zelfstandige mensen met een eigen persoonlijkheid. Als jullie maar enige karaktereigenschappen van jullie mama hebben dan komt dat zeker goed. Met jullie opmerkingen en acties houden jullie mij scherp en relativeren jullie heel veel. Ik kan niet zonder jullie!

Last but absolutely not the least, wil ik Nanneke bedanken voor al haar liefde, steun en begrip gedurende alle jaren. Ik bewonder hoe attent je bent en de betrokkenheid die je altijd toont. Je staat altijd klaar om te helpen of iets te organiseren zodat het goed verloopt. Waar anderen bij nog niet tien procent van wat jij doet excuses vinden om iets niet te doen is dat bij jou geen punt van discussie. Ik bewonder je om de niet aflatende liefde en zorg die je nu al vele moeilijke jaren aan je ouders geeft en de energie die je opbrengt om dit te blijven doen. Daar komt nog bij dat je ook in staat bent om deze liefde en zorg in toenemende mate te geven aan andere leden van de familie. De kinderen en ik mogen ons zeer gelukkig prijzen met jou in de nabijheid.

Ik heb gezegd.

## Referenties

- <sup>1</sup> Hoenderop JG, van Leeuwen JP, van der Eerden BC, Kersten FF, van der Kemp AW, Merillat AM, Waarsing JH, Rossier BC, Vallon V, Hummler E, Bindels RJ 2003 Renal Ca<sup>2+</sup> wasting, hyperabsorption, and reduced bone thickness in mice lacking TRPV5. *J Clin Invest* **112**(12):1906-14.
- <sup>2</sup> van der Eerden BC, Hoenderop JG, de Vries TJ, Schoenmaker T, Buurman CJ, Uitterlinden AG, Pols HA, Bindels RJ, van Leeuwen JP 2005 The epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5 is essential for proper osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(48):17507-12.
- <sup>3</sup> Colin EM, Van Den Bermd GJ, Van Aken M, Christakos S, De Jonge HR, Deluca HF, Prah JM, Birkenhager JC, Buurman CJ, Pols HA, Van Leeuwen JP 1999 Evidence for involvement of 17beta-estradiol in intestinal calcium absorption independent of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> level in the Rat. *J Bone Miner Res* **14**(1):57-64.
- <sup>4</sup> Nijboer J, van Brug, H., Tryfonidou, M.A., van Leeuwen, J.P.T.M. 2003 UV-B and vitamin D<sub>3</sub> metabolism in juvenile Komodo dragons. In: A. Fidgett MC, U. Ganslosser, J.-M. Hatt, J. Nijboer (ed.) *Zoo Animal Nutrition*, vol. II. Filander Verlag, Furth, pp 233-246.
- <sup>5</sup> Almeras L, Eyles D, Benech P, Laffite D, Villard C, Patatian A, Boucraut J, Mackay-Sim A, McGrath J, Feron F 2007 Developmental vitamin D deficiency alters brain protein expression in the adult rat: implications for neuropsychiatric disorders. *Proteomics* **7**(5):769-80.
- <sup>6</sup> Eyles D, Brown J, Mackay-Sim A, McGrath J, Feron F 2003 Vitamin D<sub>3</sub> and brain development. *Neuroscience* **118**(3):641-53.
- <sup>7</sup> Eyles DW, Rogers F, Buller K, McGrath JJ, Ko P, French K, Burne TH 2006 Developmental vitamin D (DVD) deficiency in the rat alters adult behaviour independently of HPA function. *Psychoneuroendocrinology* **31**(8):958-64.
- <sup>8</sup> Mackay-Sim A, Feron F, Eyles D, Burne T, McGrath J 2004 Schizophrenia, vitamin D, and brain development. *Int Rev Neurobiol* **59**:351-80.
- <sup>9</sup> Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, Hass E, Overbeck S, Andersen H, Charles P, Eriksen EF 2000 Hypovitaminosis D myopathy without biochemical signs of osteomalacic bone involvement. *Calcif Tissue Int* **66**(6):419-24.
- <sup>10</sup> Derckx P, Nigg AL, Bosman FT, Birkenhager-Frenkel DH, Houtsmuller AB, Pols HA, van Leeuwen JP 1998 Immunolocalization and quantification of noncollagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. *Bone* **22**(4):367-73.
- <sup>11</sup> Oreffo RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LF 1989 Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* **158**(3):817-23.
- <sup>12</sup> Linkhart TA, MacCharles DC 1992 Interleukin-1 stimulates release of insulin-like growth factor-I from neonatal mouse calvaria by a prostaglandin synthesis-dependent mechanism. *Endocrinology* **131**(5):2297-305.
- <sup>13</sup> Donahue SW, McGee ME, Harvey KB, Vaughan MR, Robbins CT 2006 Hibernating bears as a model for preventing disuse osteoporosis. *J Biomech* **39**(8):1480-8.
- <sup>14</sup> Donahue SW, Vaughan MR, Demers LM, Donahue HJ 2003 Bone formation is not impaired by hibernation (disuse) in black bears *Ursus americanus*. *J Exp Biol* **206**(Pt 23):4233-9.
- <sup>15</sup> McGee ME, Miller DL, Auger J, Black HL, Donahue SW 2007 Black bear femoral geometry and cortical porosity are not adversely affected by ageing despite annual periods of disuse (hibernation). *J Anat* **210**(2):160-9.
- <sup>16</sup> Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T 1993 Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* **91**(1):257-63.
- <sup>17</sup> Mundy GR 2002 Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **2**(8):584-93.
- <sup>18</sup> Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Pols HA 2004 Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* **34**(1):195-202.
- <sup>19</sup> Kanis JA, Johnell O 2005 Requirements for DXA for the management of osteoporosis in Europe. *Osteoporos Int* **16**(3):229-38.
- <sup>20</sup> Melfton LJ, 3rd, Gabriel SE, Crowson CS, Tosteson AN, Johnell O, Kanis JA 2003 Cost-equivalence of different osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* **14**(5):383-8.
- <sup>21</sup> Martin GM, LaMarco K, Strauss E, K LK 2003 Research on aging: the end of the beginning. *Science* **299**(5611):1339-41.
- <sup>22</sup> Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derckx P, Uitterlinden AG, van der Spek PJ, Visser JA, de Jong FH, Pols HA, van Leeuwen JP 2007 The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *Faseb J*.







*Deze publicatie betreft een oratie aan  
de Erasmus Universiteit Rotterdam*

ISBN 97-8907790-64-46

