

ALGEMENE SAMENVATTING

Bot is een biologisch systeem dat zich zowel op weefsel- als op cellulair niveau aanpast aan mechanische belasting. Het huidige denkbeeld is dat botcellen de belasting op de botmatrix niet direct waarnemen, maar dat ze reageren op de strain (vervorming)-geïnduceerde stroming van interstitiële vloeistof. Als gevolg van deze vloeistofstroom produceren botcellen signaalmoleculen, zoals stikstofoxide (NO) en prostaglandine E₂ (PGE₂), die de adaptieve respons van bot op mechanische belasting bepalen. Verschillende studies hebben aangetoond dat de snelheid van de mechanische belasting of stress bepalend is voor de botvorming, maar niet zozeer de hoogte van de belasting of stress. Het lijkt er dus op dat de snelheid van de belasting een bepalende factor is voor de botvorming en onderhoud. De achterliggende fysica om de relatie tussen de stress-snelheid en de fysiologische respons te begrijpen is echter nog onduidelijk.

In dit proefschrift hebben we aangetoond dat er een relatie is tussen de verhoging van de stikstofoxideproductie door botcellen en de snelheid van de vloeistofschuifspanning. Dit ondersteunt het idee dat botvorming *in vivo* meer wordt gestimuleerd door dynamische- dan door statische belasting. Deze snelheids-afhankelijke reactie trad op als de cellen eerst een zogenaamde stress-kick (een abrupte stress-toename) hadden ervaren. Beide waarnemingen kunnen aanhoudende botvorming verklaren, ondanks de sporadisch voorkomende hoge amplitude strains (vervormingen) bij normale belasting. Hoge stress-snelheden en stress-kicks zijn te verwachten bij activiteiten met een hoge impact zoals tijdens het sporten of flinke lichaamsbeweging. Dus ondanks het feit dat hoge impact activiteiten niet frequent voorkomen, zou de uit deze activiteit voortkomende stress botcellen kunnen stimuleren tot het aanzetten van de adaptieve respons van bot.

Wij hebben aangetoond dat ruis de respons van botcellen op stress verhoogt. De productie van stikstofoxide door botcellen was maximaal wanneer een optimale ruis door vloeistofschuifspanning werd gegeven. In onze studie werd

ruis door stimulatie met vloeistofschuifspanning gebruikt om mogelijke verschillen te vinden in de respons van MLO-Y4 en MC3T3-E1 cellen, die model staan voor osteocyten en osteoblasten. Door een theoretisch model te gebruiken dat een verband legt tussen stress-informatie en moleculaire respons van botcellen onder invloed van ruis, hebben we aangetoond dat er verschillen zijn in drempelwaarde-activatie voor NO en PGE₂ productie voor zowel osteocyten als osteoblasten. In situaties met hoge stress en ruis hebben MLO-Y4 cellen een hoge NO respons en MC3T3-E1 cellen een hoge PGE₂ respons. Omdat het is bekend dat NO osteoclasten op afstand houdt en dat PGE₂ de aanmaak van osteoclasten kan bevorderen, is het mogelijk dat *in vivo* osteoclasten worden geactiveerd daar waar osteocyten gelegen zijn die onder lage stress condities met ruis verkeren. Aan de andere kant worden osteoclasten geactiveerd daar waar osteoblasten zich onder hoge stress condities met ruis bevinden. Het is duidelijk dat lage stress condities leiden tot botverlies, maar dat hoge stress condities de activiteit van osteoclasten in de buurt van osteoblasten bevorderen. Verder geeft de mogelijke rol van stress door ruis bij de mechanische adaptatie van bot maar een gedeeltelijke verklaring voor het positieve effect van indirecte stress-toepassingen om botvorming te stimuleren. De drempelwaarde-activatie van botcellen duidt op het vermogen om een verhoogde respons te geven onder stresscondities die vertroebeld worden door kortdurende stress-bronnen, zoals spiervibraties, ultrasound, of vibrerende beweging, allen gekenmerkt door een hoge frequentie, lage amplitude belasting.

Wij hebben door middel van een *in vitro* assay, waarbij met twee bolletjes de viscoelasticiteit van cellen werd gekarakteriseerd, de mechanische activiteit en de mechanische gevoeligheid bepaald van verschillende soorten botcellen en fibroblasten. Mechano-activiteit wordt gekenmerkt door de inductie van trekkrachten op de aanhechtingsplaatsen van cellen, en mechano-sensitiviteit is het vermogen van cellen om krachten waar te nemen. Wij vonden dat osteocyt-achtige cellen (primaire kippen-osteocyten en MLO-Y4 cellen) relatief een hogere trekkracht induceren op aan de cel gehechte bolletjes dan osteoblast-achtige cellen (primaire kippen-osteoblasten en MC3T3-E1 cellen). Fibroblast-

achtige cellen (CCL-224) waren zelfs meer mechano-actief in vergelijking tot MLO-Y4 cellen, hetgeen de beweeglijkheid van fibroblasten *in vitro* verklaard. MLO-Y4 cellen produceerden NO gelijktijdig met de uitoefening van een toenemende kracht op de aan de cel gehechte bolletjes. Het is duidelijk dat trekkracht, vormverandering, en mogelijk de productie van signaalmoleculen gerelateerd zijn aan dezelfde pathways in respons op omgevings stress-conditions.

Hierboven hebben we twee te onderscheiden eigenschappen van de botcel-respons op vloeistofschuifspanning beschreven, namelijk snelheidsafhankelijkheid en drempelwaarde-activatie. Interessant genoeg werd de snelheidsafhankelijke respons door botcellen aangetoond bij een brede reeks frequenties die werden geïnduceerd door vibratie-stress. De uiteindelijke lokale effecten op belast bot zijn verder te begrijpen door een kwantificeerbaar samenspel tussen verschillende celtypes, als gevolg van de productie van signaalmoleculen.

Wij hebben aangetoond dat botcellen reageren op dynamische stress. Dit ondersteunt waarnemingen dat de snelheid van de belasting, maar niet zozeer de hoogte ervan een belangrijke parameter is voor de osteogene eigenschappen van mechanische belasting op bot. Dit inzicht heeft relevante gevolgen voor de lokale activiteit van osteocyten om de mechanische adaptatie van bot te regisseren. Wij hebben eveneens aangetoond dat de afgifte van signaalmoleculen door botcellen op een empirische manier is gerelateerd aan de stress-frequentie. Omdat de activatie van botcellen in hoge mate afhankelijk is van de stress-frequentie die ze waarnemen, zouden botcellen kunnen reageren op zeer kleine hoeveelheden strain (vervorming) na overschrijding van een drempelwaarde. Hierdoor zou het kunnen dat onder extreme situaties van “disuse” (gewichtsleloosheid) het hoge botverlies voorkomen kan worden door sporadische hoge impact belasting. Wij hebben verbanden aangetoond tussen parameters die wij relevant achten voor de mechano-transductie in bot, dat wil zeggen de toegepaste stress, de hoeveelheid signaalmoleculen geproduceerd door osteocyten, en de mogelijke rol van osteocyten als

regisseurs van de lokale activiteit van osteoclasten en osteoblasten. Botverlies kan worden uitgelegd als het resultaat van een verstoring van de homeostase van deze parameters. Omdat deze parameters aan elkaar gerelateerd zijn, zoals wij hebben aangetoond, zou het kunnen dat hun homeostase hersteld wordt ondanks de extreme omstandigheden van “disuse”.

De vraag hoe cellen gewichtsluosheid rechtstreeks kunnen waarnemen blijft echter bestaan. Wij hebben de activiteit van botcellen bepaald door de krachten te meten die de cellen induceren op aan de cel gehechte bolletjes, die zijn gecoat met fibronectine. We hebben aangetoond dat de krachtschommeling van botcellen een karakteristiek frequentiepatroon heeft. Deze krachtschommeling is kenmerkend voor intracellulaire processen. Het karakteristieke patroon was een aanwijzing voor de verspreide eigenschappen van intracellulaire deeltjes en celorganellen. Verspreide processen besturen de relatie tussen de reorganisatie van microtubuli, en mogelijk intracellulair transport, die door de zwaartekracht beïnvloed zouden kunnen worden. Intracellulair transport zou daarom cruciaal kunnen zijn voor mechano-sensing. Botcellen zouden veranderingen in het zwaartekrachtsveld rechtstreeks kunnen waarnemen doordat winst of verlies aan zwaartekracht de restructurering van zelf-organiserende polymeren binnen de cel beïnvloedt, en daardoor het intracellulaire transport. Het is daarom mogelijk dat het patroon van krachtschommelingen binnen een cel verandert onder gewichtsluosheid, hetgeen de botcel mechano-gevoeligheid beïnvloedt zoals blijkt uit een veranderde productie van signaalmoleculen.