

# VU Research Portal

## **Bone-site-specific responses to bisphosphonates**

Vermeer, A.F.

2014

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Vermeer, A. F. (2014). *Bone-site-specific responses to bisphosphonates: Long bone and jaw compared.*

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## **Algemene samenvatting**

Botremodellering is een levenslang durend proces dat belangrijk is voor het behoud van een goed functionerend skelet en voor mineraalhomeostase. Meerkernige osteoclasten breken bot af, terwijl osteoblasten het opnieuw opbouwen. Osteocyten ondervinden mechanische belasting, reageren hierop en reguleren osteoblast- en osteoclastactiviteit. Als osteoclasten te actief zijn, bijvoorbeeld bij ziektes zoals osteoporose en naar bot uitgezaaide kanker, kunnen bisfosfonaten (BP) gebruikt worden om de activiteit te remmen. Met een toenemende levensverwachting zullen deze ziektes waarschijnlijk vaker voorkomen en daarom zullen mogelijke bijwerkingen van anti-resorberende behandelingen een groter probleem worden. Osteonecrose van de kaak is een zeldzame, maar ernstige bijwerking van BP en het is niet duidelijk hoe en waarom juist de kaak hierdoor wordt aangedaan. Onze hypothese was dat osteonecrose van de kaak veroorzaakt wordt door een verschillende reactie van botspecifieke osteoclasten en hun voorlopers op BP. We hebben verschillende benaderingen toegepast om te onderzoeken hoe BP pijpbeen- en kaakosteoclasten en hun voorlopers verschillend kunnen beïnvloeden. Met deze studies, die in dit hoofdstuk zijn samengevat, trachtten we meer inzicht te krijgen in (i) verschillend tussen botspecifieke osteoclasten en hun voorlopers en (ii) de pathogenese van bisfosfonaat gerelateerde osteonecrose van de kaak.

In **hoofdstuk 2** hebben we de opname van BP door pijpbeen- en kaakosteoclastvoorlopercellen onderzocht en het effect op osteoclastogenese en apoptose bestudeerd in pijpbeen en kaak beenmergcellen geïsoleerd uit gezonde muizen. Kaakosteoclastvoorlopercellen namen meer BP op dan pijpbeenosteoclastvoorlopers. Dit ging gepaard met een ophoping van meer ongeprenyleerd Rap1a in osteoclastvoorlopercellen uit de kaak. Fascinerend was dat een hogere intracellulaire BP concentratie niet leidde tot een ander effect op osteoclastogenese van pijpbeen- en kaakbeenmergcellen. Dit zou veroorzaakt kunnen zijn door een hogere expressie van anti-apoptotische genen en een lagere caspase 3/7 activiteit in de kaak- dan in pijpbeenosteoclastkweken. We laten met deze data zien dat kaakosteoclasten of hun voorlopercellen wellicht minder gevoelig zijn voor bisfosfonaten dan deze cellen uit pijpbeenderen.

In **hoofdstuk 3** werd het effect van bisfosfonaten op pijpbeen- en kaakosteoclasten en botremodellering onderzocht *in vivo*. Vrouwelijke C57BL/6J muizen kregen gedurende 1, 3 of 6 maanden wekelijks een toediening van zoledroninezuur. Dit leidde niet tot een significant effect op het aantal osteoclasten, zowel in pijpbeenderen als in de kaak. Daarmee bevestigen we de resultaten van het *in vitro* werk dat BP geen ander effect hebben op osteoclastogenese in de verschillende botten. Bovendien waren het botvolume en de mineraaldichtheid vergelijkbaar hoger in de pijpbeenderen en in de kaak na behandeling met bisfosfonaten. Echter, het aantal beenmergcellen dat geïsoleerd kon worden uit de kaak was 4 keer lager in de BP behandelde groep dan in de controles. Het

aantal beenmergcellen in de pijpbeenderen daarentegen was niet beïnvloed door BP. Deze resultaten geven aan dat BP de osteoclastvoorlopercellen of andere beenmergcellen alleen in de kaak aantasten. Botvorming daarentegen was juist geremd op de langere termijn in de pijpbeenderen, terwijl botvorming in de kaak niet was beïnvloed door een zesmaands behandeling met BP. Tot slot hebben we nóg een botafhankelijk effect van BP aangetoond; zoledroninezuur stimuleerde osteoclastvorming aan de wortels van de bestudeerde kies. Ook resorbeerden deze cellen de wortels. Daarom hebben we in **hoofdstuk 4** humane cellen gebruikt om te onderzoeken of deze inductie of stimulering gemedieerd kan zijn door parodontaal ligament (PDL) fibroblasten behandeld met BP. Voorbehandeling van PDL fibroblasten met een hoge concentratie pamidronaat was toxisch, niet alleen voor de fibroblasten zelf, maar ook voor de PBMCs (die de osteoclastvoorlopercellen) in cokweek met de voorbehandelde fibroblasten. BP concentraties die niet toxisch waren voor PDL fibroblasten hadden geen invloed op osteoclastogenese in cokweek met PBMCs.

Om eerdere fases van osteoclastvorming te bestuderen hebben we *time-lapse* microscopie gebruikt om de fusie tussen pijpbeenosteoclastvoorlopers en meerkernige osteoclasten te visualiseren (**hoofdstuk 5**). We zagen fusie tussen (i) eenkernige cellen, (ii) meerkernige cellen en (iii) tussen een meerkernige en een eenkernige cel. Uiterst boeiend was de bevinding dat meerkernige cellen zich konden opsplitsen, een proces dat gemedieerd zou kunnen zijn door kleine cellen met één kern in het beenmerg. In de cellulaire compartimenten die ontstonden als gevolg van deze splitsingen zagen we soms apoptotische kernen. Daarom vermoeden we dat osteoclasten door dit unieke splitsingsproces apoptotische kernen kunnen afstoten.

In **hoofdstuk 6** hebben we *time-lapse* microscopie gebruikt om vroege processen gedurende osteoclastogenese (proliferatie, migratie en fusie) van pijpbeen- en kaakbeenmergcellen te bestuderen. Ook hebben we de expressie geanalyseerd van genen die betrokken zijn bij deze processen en hebben we het effect onderzocht van BP op osteoclastvoorloper migratie. Pijpbeen- en kaakosteoclastvoorlopers deelden, migreerden en fuseerden met gelijke snelheden. BPs hadden geen effect op de migratie van beide voorlopers. Osteoclastvoorlopercellen geïsoleerd uit de kaak hadden een hogere genexpressie van CXCL12, CXCR4 en CXCR7 dan deze cellen uit pijpbeenderen. Deze genen zijn betrokken bij de directionele migratie van cellen richting het beenmerg en het is ook aangetoond dat CXCL12 betrokken is bij het remmen van apoptotische genexpressie in osteoclast voorlopers. Doordat wij hier aantonen dat CXCL12 expressie hoger is in kaak- dan in pijpbeenosteoclastvoorlopers, bieden wij hier meer mechanistisch inzicht in de grotere anti-apoptotische capaciteit van kaakosteoclasten of hun voorlopers ten opzichte van deze in de pijpbeenderen.

Alles tezamen leveren wij extra bewijs voor het bestaan voor botspecifieke osteoclasten en hun voorlopercellen in het beenmerg. De bevinding dat kaakosteoclasten minder gevoelig zijn voor bisfosfonaten onderschrijft onze hypothese dat botspecifieke osteoclasten een bijdrage kunnen leveren aan het ontstaan van osteonecrose van de kaak. Mede op basis hiervan poneren wij een nieuwe hypothese voor de pathogenese van osteonecrose van de kaak, waarbij twee eerder in de literatuur geopperde hypothesen samen worden gevoegd: ondanks de aanwezigheid van bisfosfonaten overleven de meer apoptose resistente kaakosteoclasten langer dan de cellen in de pijpbeenderen. Als gevolg daarvan wordt meer kaakbot geresorbeerd waardoor er meer BP vrijkomt van het bot. Dit leidt ertoe dat lokaal meer BP beschikbaar zijn voor opname door omliggende cellen. Het toxisch effect op andere cellen kan een aanleiding zijn voor het ontstaan van osteonecrose van de kaak. Namelijk, een dodelijk effect op bijvoorbeeld immuuncellen, de verminderde capaciteit om een infectie te boven te komen en de resulterende verlaging van de pH zou kunnen leiden tot het vrijkomen van nog meer bisfosfonaten waardoor een vicieuze cirkel ontstaat.

Deze hypothese impliceert dat specifiek de kaak osteoclasten een rol kunnen spelen in de pathogenese van osteonecrose van de kaak en benadrukt daarmee de behoefte aan de ontwikkeling van specifiekere resorptieremmende medicijnen. Hiervoor is het verrichten van meer onderzoek cruciaal zodat we beter inzicht krijgen in de verschillen tussen botspecifieke osteoclasten.