



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Zien is geloven en zien is genezen

Löwik, C.W.G.M.

### Citation

Löwik, C. W. G. M. (2008). *Zien is geloven en zien is genezen*. Leiden: Universiteit Leiden.  
Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19871>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/19871>

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

## **Zien is geloven en zien is genezen**

De uitdrukking “ongelovige Thomas” vindt zijn oorsprong in het ongeloof van de apostel Thomas die niet geloofde dat Jezus uit zijn graf was opgestaan. Christus was verschenen aan zijn discipelen, maar op dat moment was Thomas niet aanwezig. Hij wilde de opstanding van Christus pas geloven als hij de wonden van Christus zou zien en zijn vinger erop kon leggen. Later verscheen Jezus opnieuw aan zijn leerlingen en toonde toen de wond in zijn zij, die een Romeinse soldaat hem voor de kruisiging had toegebracht met een lans, en nodigde Thomas uit zijn vinger erin te steken. Pas toen geloofde Thomas dat het zijn meester was. Christus zei toen tegen Thomas: 'zalig zijn zij die niet zien en toch geloven' (Joh. 20: 24-29).

Prof. dr. C.W.G.M. Löwik is per 1 december 2006 benoemd tot hoogleraar Moleculaire Endocrinologie door het College van Bestuur van de Universiteit Leiden. Het gaat om een strategische leerstoel bij de afdeling Endocrinologie en stofwisselingsziekten.

---

Mijnheer de Rector magnificus, zeer gewaardeerde toehoorders,

In oktober 2006 verscheen een man van 49, in de bloei van zijn leven, bij de afdeling cardiologie op het LUMC met de klacht dat hij een beklemmend gevoel op de borst had, met name bij inspanning. Na een fietstest werd duidelijk dat er zich waarschijnlijk ergens, in een van de kransslagaders, een vernauwing moest bevinden. De man die altijd gesport had, naar zijn werk fietste en nooit gerookt had kon niet geloven dat er iets aan zijn hart mankeerde. De man werd direct opgenomen voor een angiografie door middel van een catheterisatie via de lies.

Toen het contrastmiddel werd ingespoten, werd zowel voor de cardioloog als voor de man zelf, die via de monitor kon meekijken, zichtbaar dat er zich twee vernauwingen bevonden in een van zijn kransslagaders.

De man werd gedotterd en er werden twee “stents” ingebracht. Dit zijn een soort “kippengaasjes” die door middel van het opblazen van een ballonnetje in het bloedvat worden geplaatst. De man beseftte na de beelden zelf gezien te hebben pas dat hij een hartprobleem had. Opnieuw dus “zien is geloven”.

Hij mocht de volgende dag alweer naar huis. Uit labonderzoek kwam naar voren dat de man een veel te hoog cholesterol had dat later erfelijk bleek te zijn in de familie van zijn moeders kant. Hij vertelde aan de cardioloog dat zijn moeder minder geluk had zo een 25 jaar geleden en op 55 jarige leeftijd aan hartproblemen is overleden omdat de doktoren toen niet veel konden doen. De man slikt nu dagelijks een tablet met daarin een effectieve nieuwe generatie cholesterolremmer, een zogenaamde “statine”, en een tablet “ascal” met daarin een kleine dosis aspirine. Het gaat nu zeer goed met hem.

Dit verhaal geeft aan dat in de afgelopen 25 jaar veel is veranderd en dat er nu levens gered kunnen worden die toen niet gered konden worden. Dit is voornamelijk mede mogelijk geworden door de enorme ontwikkeling op het gebied van de medische imaging technologie, waarbij tegenwoordig met minimaal invasieve technieken of zelfs geheel non-invasieve technieken beelden gemaakt kunnen worden van allerlei van ziekteprocessen. Niet alleen van hart- en vaatziekten, neurodegeneratieve ziekten zoals Alzheimer, Parkinson en hersenbloedingen, maar ook van allerlei vormen van kanker.

Medische imaging apparatuur : Ultrasound, PET/SPECT, CT, MRI

De beelden kunnen gevormd worden met allerlei verschillende technieken zoals

- ultrasound, waarbij gebruik gemaakt wordt van geluidsgolven;
- PET of SPECT, waarbij gebruik gemaakt wordt van radioactieve stoffen die straling uitzenden;
- CT waarbij gebruik gemaakt wordt van röntgenstraling en
- MRI waarbij we gebruik maken van elektromagnetische straling en geluidsgolven.

De vooruitgang van de technologie heeft er ook toe geleid dat de apparatuur ook steeds kleiner gemaakt kon worden, waardoor het mogelijk werd om dezelfde fysiologische en pathofysiologische ziekteprocessen in proefdieren in beeld te brengen en te bestuderen. Dit maakte het voorts weer mogelijk om niet alleen sneller, maar ook betere medicijnen en therapieën te ontwikkelen om deze vervolgens weer op patiënten toe te passen.

### **Translationeel onderzoek**

Dit alles is alleen mogelijk door wat we nu noemen “translationeel onderzoek”. Dat wil zeggen dat we nieuwe bevindingen uit preklinisch laboratoriumonderzoek in cellen en proefdieren direct vertalen naar de kliniek toe. U begrijpt dat het zichtbaar maken van allerlei processen, en in het bijzonder ziekteprocessen, met behulp van moderne imaging technieken, zowel bij proefdieren als bij mensen, een essentieel hulpmiddel is bij hedendaags translationeel onderzoek.

Een prachtig voorbeeld van modern translationeel onderzoek is te vinden in ons eigen botonderzoek, waarbij we op zoek zijn naar nieuwe behandelingsmethoden voor ziekten gekenmerkt door ernstig botverlies, bijvoorbeeld ten gevolge van osteoporose, in de volksmond ook wel botontkalking genoemd, of ten gevolge van uitzaaiingen in het skelet van bijvoorbeeld borstkanker.

### **Osteoporose**

In tegenstelling tot wat veel mensen denken is bot een zeer dynamisch weefsel dat voortdurend wordt omgebouwd, dat wil zeggen continue wordt opgebouwd en afgebroken. De opbouw gebeurt door de botvormende cellen, de osteoblasten, en de afbraak door de botafbrekende cellen, de osteoclasten. Om dit gemakkelijk te onthouden leer ik de studenten het simpele ezelsbruggetje: blasten bouwen en clasten kauwen.

Bij gezonde volwassenen is de aanmaak en afbraak van het bot in evenwicht waardoor de botmassa constant blijft. Bij osteoporose is de balans uit evenwicht. We maken eigenlijk onderscheid tussen 2 vormen van osteoporose, namelijk.

ouderdomsosteoporose en post-menopausale osteoporose

1. Met ouderdomsosteoporose krijgen we allemaal te maken, simpelweg omdat we steeds ouder worden. Algemeen wordt aangenomen dat de oorzaak ligt in het slechter functioneren van de botvormende cellen door veroudering. De botafbraak gaat gewoon door. Hierdoor verschuift het evenwicht naar botafbraak en verlies je dus bot.

Post-menopausale osteoporose komt, zoals het woord al aangeeft, voor bij vrouwen na de menopauze. Door het verlies van oestrogenproductie door de eierstokken gaan de osteoclasten meer bot afbreken en verschuift het evenwicht dus ook naar de botafbraak.

Zoals u op het plaatje kunt zien, verliezen vrouwen dan versneld bot, waardoor het bot dus letterlijk poreus wordt en de kans op het inzakken van wervels en botbreuken enorm toeneemt. Of er werkelijk ook botbreuken zullen ontstaan is mede afhankelijk van een aantal factoren zoals erfelijke elementen en life-style, en dan in het bijzonder voeding en beweging.

Zo is voldoende calciumrijke voeding in combinatie met voldoende vitamine D belangrijk om genoeg calcium op te nemen en op te slaan in het bot. Vitamine D zit in bepaalde voedingsmiddelen, maar wordt ook aangemaakt in onze huid door zonlicht als we in de zon lopen. Beweging is belangrijk omdat hierdoor de botaanmaak gestimuleerd wordt. We kunnen dus wel degelijk zelf wat doen om de kans op osteoporose te verminderen.

Echter, in veel gevallen komt er, door welke redenen dan ook, toch ernstige osteoporose voor. Zeker ook omdat, zoals al eerder vermeld, de populatie steeds ouder wordt. Gelukkig hebben we tegenwoordig goede medicijnen tegen botverlies waarvan de, door onze afdeling ontwikkelde, bisfosfonaten een van de belangrijkste medicijnen zijn op dit moment. Ik ben er met recht trots op dat ik, onder leiding van mijn oude leermeester en pionier op het gebied van bisfosfonaatonderzoek, Prof.dr. Olav Bijvoet en Socrates Papapoulos, een bijdrage heb mogen leveren aan de uiteindelijke opheldering van het mechanisme van werking van bisfosfonaten en hun toepassingen in de kliniek.

## **Bisfosfonaten**

Bisfosfonaten zijn fosfaatachtige verbindingen die hun oorsprong vinden in de wasmiddelenindustrie als mogelijke wasverzachters. De reden hiervoor is dat deze fosfaatachtige stoffen goed calcium kunnen binden. Ze zijn echter nooit als wasverzachter gebruikt, omdat ze niet biologisch afbreekbaar zijn en dus het milieu zouden vervuilen. Dankzij het baanbrekende werk van de helaas recent overleden Prof.dr. Herbie Fleish uit Zwitserland en onze eigen Olav Bijvoet bleken de bisfosfonaten na inspuiting zich direct en specifiek alleen aan het bot te hechten waar ze de afbraak van

bot door de botafbrekende cellen te verhinderen. Het is opmerkelijk dat na de ontdekking van de werking van bisfosfonaten het nog bijna 30 jaar geduurd heeft voordat we ook het moleculaire mechanisme ontrafeld hadden. Vooral het werk van Ermond van Beek in onze groep is cruciaal geweest.

Voor het bestuderen van bisfosfonaten hebben we destijds allerlei botafbraak modellen, gebaseerd op het kweken van muizenbotjes, geïntroduceerd. Hiermee hebben we niet alleen het werkingsmechanisme ontrafeld, maar konden we ook allerlei nieuwe bisfosfonaten vinden die vele malen krachtiger en beter waren dan de eerste generatie bisfosfonaten.

We ontdekten dat het geheim zat in de aanwezigheid van de stikstof groep die op het plaatje in rood is aangegeven. Op deze ontdekking zijn nu alle geregistreerde zeer effectieve bisfosfonaten gebaseerd. Ook de meest krachtige tot nu toe, namelijk Zolendronaat, beter bekend als Zometa, waarvan is aangetoond dat je die zelfs maar een keer per jaar hoeft te geven om botverlies tegen te gaan.

De bisfosfonaten zijn dus een enorm succes gebleken als medicijnen tegen overmatige botafbraak en behoren nu tot een van de meest verkochte medicijnen in de wereld. Echt iets om enorm trots op te zijn.

Maar het succesverhaal van onze botonderzoeksgroep gaat verder.

Nog voor het hoogtepunt van het succes van de bisfosfonaten, realiseerde ik, en vele met mij, dat we, naast goede en krachtige remmers van botafbraak, ook stoffen nodig hebben die de botaanmaak kunnen stimuleren. In de klinische praktijk blijkt namelijk dat veel, zo niet de meeste, vrouwen met ernstige osteoporose pas in het ziekenhuis terechtkomen als ze botbreuken van wervels of heupkoppen oplopen. We kunnen met bisfosfonaten dan wel direct verder botverlies voorkomen, maar niet het verloren gegaan bot teruggeven. Er was dus een grote behoefte aan medicijnen of therapieën die de botaanmaak kunnen stimuleren. De wereldwijde zoektocht naar de heilige graal van de botaanmaak was toen in volle hevigheid begonnen. En ik kan u al verklappen, wij hebben hem gevonden!

### **Sclerosteose en de ontdekking van Sclerostin.**

Door ons succesvol botonderzoek met bisfosfonaten had ik het geluk om in 1997 in contact te komen met David Galas en Jeff van Ness, die destijds in Seattle werkten voor de firma Chiroscience. Zij hadden het interessante idee om op zoek te gaan naar een ziekte die het tegenovergestelde is van osteoporose, dus waar er niet te weinig maar teveel bot wordt aangemaakt. Er bleek niet één, maar zelfs twee, zeer zeldzame, op elkaar lijkende ziekten te bestaan die hieraan voldeden, namelijk Sclerosteose en de ziekte van Van Buchem.

Het is een echt spannend verhaal met een duidelijk Nederlands accent, aangezien sclerosteose vooral voorkomt onder Zuid Afrikaners van Nederlandse afkomst en de

ziekte van Van Buchem bijna uitsluitend voorkomt onder inwoners van Urk. Het interessante aan de ziekten is dus dat de patiënten enkel en alleen te veel bot aanmaken.

Om te laten zien hoeveel bot deze patiënten hebben, ziet u hier een plaatje van een weegschaal met daarop aan een kant drie normale schedels en aan de andere kant een schedel van een sclerosteose patiënt uit Zuid-Afrika. Deze heeft zoveel bot dat hij doorslaat naar de kant van de patiënt. Verder kunt u ook zien aan de röntgenfoto en doorsnede van zo een' schedel, hoe enorm dik hij is.

Als het gen en het daarvoor coderende eiwit dat deze ziekten veroorzaakt gevonden kon worden, zou dit een nieuwe behandeling voor osteoporose, in de vorm van nieuwe botvorming, mogelijk een hele stap dichterbij kunnen brengen.

Zoals ik al heb verkapt, is het gen en het daarvoor coderende eiwit, dat sclerostin werd genoemd, inderdaad gevonden door de groep van Galas en Van Ness waarmee we samenwerkten. Anticiperend op het feit dat het te maken zou hebben met botaanmaak hadden wij in ons laboratorium al ruim van tevoren verschillende nieuwe modellen opgezet om botvorming te bestuderen. Wij kregen veel geld voor het onderzoek en ik had het geluk een van mijn beste studenten voor dit onderzoek te kunnen interesseren, te weten Rutger van Bezooijen. Opnieuw lachte het geluk ons toe want uit ons onderzoek bleek dat het eiwit sclerostin, inderdaad uitsluitend voorkomt in bot en nergens anders.

Zoals u op het plaatje kunt zien, hebben wij ontdekt dat sclerostin specifiek gemaakt wordt door speciale cellen diep in het bot, de zogenaamde osteocyten. Dit zijn cellen afkomstig van de botvormende osteoblasten, die als een soort zenuwstelsel met elkaar verbonden zijn via allerlei kanaaltjes in het bot, de canaliculi. Via deze kanaaltjes kunnen ze signalen afgeven naar de osteoblasten op het botoppervlak om meer of minder bot te maken. Een van deze signalen is sclerostin.

Het sclerostin, gemaakt en uitgescheiden door de osteocyten, bereikt via de kanaaltjes in het bot de osteoblasten op het botoppervlak met de opdracht de botaanmaak te stoppen, omdat de osteocyten geregistreerd hebben dat er genoeg bot aanwezig is.

Als er lokaal te weinig bot aanwezig is, stoppen de osteocyten met sclerostin productie waardoor de osteoblasten op het botoppervlak actief worden en veranderen van rustende platte cellen in actieve ronde cellen.

Vervolgens zullen de actieve osteoblasten botmatrix gaan vormen die daarna verkalkt. Als de osteocyten hebben geregistreerd dat er genoeg bot is gemaakt, komt de sclerostin productie weer opgang.

En als alle osteocyten weer sclerostin maken, komen de osteoblasten weer tot rust.

Sclerostin is dus een negatieve regulator van de botaanmaak. Uit het genonderzoek en uit ons eigen onderzoek bleek dat bij patiënten met sclerosteose en bij de ziekte van Van

Buchem het eiwit sclerostin afwezig is, waardoor de osteoblasten op het botoppervlak continue door blijven gaan met het aanmaken van bot. De rem is er dus volledig van af.

Wat je echter bij patiënten met osteoporose zou willen, is om de rem er tijdelijk vanaf te halen zodat ze meer bot gaan vormen. Om een lang verhaal kort te maken zijn er nu nieuwe medicijnen in de maak, in de vorm van antilichamen, die het uitgescheiden sclerostin weg kunnen vangen, waardoor er meer bot gevormd wordt. Afhankelijk van de hoeveelheid en de duur van de behandeling kunnen we de botvorming dus weer stimuleren. De eerste resultaten in proefdieren, en recentelijk ook in vrouwen, zien er spectaculair uit. Dit jaar nog zullen er grote studies opgezet worden met dit nieuwe medicijn voor de behandeling van osteoporose. Als het meezit, zal dit hopelijk binnen niet al te lange tijd beschikbaar komen voor alle patiënten met ernstige osteoporose.

Uit beide verhalen blijkt inderdaad dat een goede integratie tussen laboratorium en kliniek essentieel is voor succes en op die manier goed translationeel kan zijn.

## **Imaging**

Nu terug naar de imaging en naar zien is geloven en zien is genezen.

Naast osteoporose is metastasering van borst- en prostaatkanker naar het skelet een van de meest ernstige botaandoeningen die we kennen en verdient daarom onze extra aandacht. In het bijzonder de zeer ernstige botafbraak, die vaak gezien wordt bij vrouwen met uitzaaiingen van borstkanker in het skelet, geven ernstige morbiditeit. Gelukkig kunnen we de botafbraak goed in de hand houden met bisfosfonaten, maar de groei van de tumoren in het bot kunnen we niet stoppen.

Om de uitzaaiingen van tumoren goed te kunnen bestuderen en te vervolgen hebben we namelijk betere modellen en gevoeliger imaging technieken nodig.

Zoals reeds eerder gezegd, heeft de vooruitgang van de technologie er toe geleid dat de imaging apparatuur steeds kleiner gemaakt kon worden. Hierdoor is het nu mogelijk om in proefdieren, ziekteprocessen zoals tumorgroei en metastasering, in een zeer vroeg stadium in beeld te brengen, te vervolgen en nog belangrijker, het effect van nieuwe medicijnen of therapieën hierop te bestuderen.

Maar de ontwikkeling gaat nog steeds verder en de laatste vijf jaar is de imaging in proefdieren zelfs mogelijk op celbiologisch en moleculair niveau. We noemen dit nieuwe onderzoeksveld dan ook niet voor niets “Molecular Imaging”.

Molecular Imaging is een relatief nieuwe discipline binnen het wetenschappelijk onderzoek die een brug slaat tussen de moleculaire celbiologie en allerlei non-invasieve imaging technologieën in levende wezens. Het heeft als doel het zichtbaar maken en vervolgen, en waar mogelijk ook kwantificeren, van allerlei moleculaire en cellulaire processen al dan niet gerelateerd aan specifieke ziekten of bepaalde fysiologische processen.

Zoals in dit plaatje is aangegeven, is het duidelijk dat Molecular Imaging een onmisbare technologie is voor modern translationeel medisch onderzoek. De vraag is dan ook wat willen we hiermee precies bereiken?

Zo is bijvoorbeeld het “humane genome” project, met als doel om alle menselijke genen in kaart te brengen, een aantal jaar geleden voltooid. Een fantastische mijlpaal in de wetenschap die in principe enorme mogelijkheden biedt op het gebied van preventie, vroegdiagnostiek en behandeling van allerlei ziekten. Echter, de grootste uitdaging moet nog komen namelijk de vraag “wat is de precieze functie van al deze genen en hoe zijn ze betrokken bij het ontstaan van bepaalde ziekten”. Hiervoor moeten we weten waar en wanneer ze tot expressie komen in het lichaam en hoe ze worden gereguleerd. Hiervoor hebben we een mooie Engelse term bedacht te weten, “Functional Genomics”.

Naast het in beeld brengen van genexpressie in tijd en plaats willen we ook graag allerlei belangrijke moleculaire, celbiologische, fysiologische en pathologische processen zichtbaar kunnen maken die betrokken zijn bij allerlei ziekten, zoals kanker, diabetes en hersenziekten.

Zo willen we bijvoorbeeld niet alleen graag belangrijke processen als celgroei, celmigratie, celdifferentiatie en celdood kunnen volgen, maar ook processen als tumorgroei en metastasering, nieuwe bloedvatvorming, weefselafbraak door enzymen, infecties en ontstekingen. Al deze processen willen we niet alleen zichtbaar kunnen maken in levende dieren maar ook kunnen meten.

Tot slot is de moleculair imaging technologie ook uitermate geschikt bij het optimaliseren van nieuwe behandelingsmethoden voor de kliniek, zoals het ontwikkelen van nieuwe therapieën en medicijnen.

Om dit allemaal te kunnen doen maken wij zelf gebruik van de allernieuwste optische beeldvormingstechnologie, ook wel kortweg optical imaging genoemd. We gebruiken hiervoor bioluminescentie- of fluorescentie licht, in combinatie met supergevoelige camerasystemen. Hoe werkt dat precies.

### **Bioluminescentie imaging**

Licht afkomstig van bioluminescentie kennen we allemaal van glimwormen, diepzeekwallen en vuurvliegjes. Het bioluminescentielicht ontstaat door de omzetting van luciferine met zuurstof en ATP naar oxyluciferine onder invloed van het enzym luciferase. Het luciferine molecuul is enorm klein en onschuldig en gaat gemakkelijk het celmembraan over. Als je dit in muizen spuit zal het binnen enkele minuten in alle lichaamsvloeistoffen aanwezig zijn en dus elke cel van het lichaam bereiken. Als er ergens in het lichaam luciferase aanwezig is, zal er specifiek op die plek dus licht worden gegenereerd. Hoe meer luciferase hoe meer licht. Een deel van het uitgezonden licht zit in het rode spectrum dat dwars door elk weefsel heen gaat. Neem maar eens een zaklantaarn en houdt die voor je hand. Dan zie je dat alleen de rode kleur er doorheen schijnt. Dit komt niet door rode kleur van je bloed, maar door het feit dat alleen het licht in het rode



spectrum in staat is door het weefsel heen te dringen. Dit licht, ook wel fotonen genoemd, is in tegenstelling tot röntgenstralen volkomen onschadelijk. Door deze kennis en de ontwikkeling in de laatste jaren van uiterst gevoelige CCD camera's, is het nu mogelijk om dit licht zichtbaar te maken en te meten in levende dieren. Daarmee is de techniek van Bioluminescentie Imaging, afgekort BLI, geboren.

Bioluminescentie is uitermate geschikt voor het volgen van allerlei cellen zoals tumorcellen en stamcellen. Hiervoor hebben we in de cellen het luciferase-gen ingebouwd, en wel op een zodanige manier dat ze continue flinke hoeveelheden luciferase maken, zodat er een sterk signaal verkregen wordt.

Laat ik het principe van de bioluminescentie imaging eens illustreren aan de hand van tumorcellen, die we getransplanteerd hebben in muizen, die vervolgens een tumor gaan vormen.

Op dit plaatje zie je links dat we luciferase tot expressie brengende tumorcellen inspuiten in een muis. Vervolgens kunnen we op ieder zelf gekozen moment in de tijd de muis even verdoven, luciferine inspuiten, en de muis in het camerasysteem brengen. Na enkele minuten wachten druk je op een knopje, waarna een opname wordt gemaakt die slechts enkele seconden duurt. De data worden gedigitaliseerd, opgeslagen en zijn klaar voor verdere analyse.

Hoe dat er in het echt uitziet kunt u op het volgende plaatje zien.

In elk van de twee muizen is een miljoen tumorcellen ingespoten in de flank. Een aantal dagen later wordt een opname gemaakt. Er is dan met het oog niets te zien en ook niets te voelen. Het uiteindelijke plaatje bestaat uit twee componenten. Eerst wordt een normale foto genomen van de muis en daarna automatisch een opname van het bioluminescentielicht.

Vervolgens worden de beelden over elkaar heen gelegd en zie je dus waar de tumorcellen zich bevinden.

De hoeveelheid licht wordt in een kleurspectrum weergegeven en ieder kleur correspondeert met een hoeveelheid licht en dus ook met een hoeveelheid tumorcellen.

Op het volgende plaatje ziet u niet alleen dat je met deze methode heel snel tumorgroei kan volgen, maar ook het effect van behandeling. Boven ziet u een zeer snel groeiende menselijke hersentumor in het brein van een muis en onder ziet u het effect van behandeling met een cytostaticum. De behandeling wordt na vier weken gestart en u ziet duidelijk dat de tumor door de behandeling slinkt.

Deze aanpak hebben we ook toegepast bij ons onderzoek naar uitzaaiingen van borstkanker naar bot. De borstkankercellen hebben namelijk de vervelende eigenschap dat ze bij voorkeur uitzaaien naar het skelet. Op plaatsen van de uitzaaiing leidt dit bij vrouwen tot ernstige botafbraak en botbreuken.

In loop der jaren heeft Gabri van der Pluijm op onze afdeling een proefdiermodel opgezet waarbij we de metastasering van borstkankercellen naar het bot kunnen bestuderen. We maken gebruik van een zeer kwaadaardige menselijke borstkankercellijn. Als we die in een naakte muis, dat is een muis zonder goed werkend afweersysteem, spuiten, dan zullen slechts een paar tumorcellen zich op bepaalde plekken in het skelet innestelen en gaan groeien. Je spreekt dan van micrometastasen. Als de metastasen groter worden stimuleren ze lokaal de botafbrekende cellen waardoor het skelet enorm wordt afgebroken. Zoals je op de röntgenopnamen van de muis kunt zien ontstaan er, net zoals dat bij patiënten gebeurt, door ernstige botafbraak grote gaten in het bot wat niet alleen erg pijnlijk is maar ook leidt tot botbreuken.

Wat we nu gedaan hebben is dat we het vuurvliegjesgen luciferase stabiel hebben ingebouwd in deze borstkankercellen die dus uitzaaien naar het skelet. Als we nu luciferine in de muis spuiten, zal er op de plaatsen waar tumorcellen zitten licht vrijkomen dat we met de fotoncamera zichtbaar kunnen maken.

Met deze techniek kunnen we al enkele honderden tumorcellen zichtbaar maken die diep in het bot aanwezig zijn en nog ruim voordat er botafbraak plaatsvindt. Deze techniek is dus veel gevoeliger dan de röntgenopnamen waar alleen maar de indirecte gevolgen van reeds grotere uitzaaiingen te zien zijn, namelijk sterke botafbraak en het ontstaan van gaten in het bot.

We hebben sinds kort de beschikking over een CT scanner die drie dimensionale röntgenopnamen kan maken waardoor het botverlies en, zoals u zelf kunt zien, het ontstaan van gaten in het bot veel gevoeliger en nauwkeuriger gemeten kan worden.

Het grote voordeel van Bioluminescentie imaging is dat, in tegenstelling tot röntgenopnamen, we alle kleine uitzaaiingen kunnen zien en meten, ook die in zachte weefsels als lever en long. Al met al kunnen we nu dus veel sneller en gevoeliger allerlei medicijnen testen die tumorgroei en uitzaaiingen tegengaan.

Zo onderzochten we natuurlijk ook de effecten van de bisfosfonaten, die nu dus veel worden gebruikt voor de behandeling van botafbraak ten gevolge van uitzaaiingen van borstkanker in het skelet.

Op het plaatje is links het effect te zien van het door ons ontwikkelde krachtige bisfosfonaat Olpadronaat op de botafbraak. Zoals u kunt zien is het middel zeer effectief en remt het sterk de botafbraak.

Maar het is ook duidelijk zichtbaar met bioluminescentie imaging dat het bisfosfonaat niet of nauwelijks effect heeft op de tumorgroei en dus op het aantal kankercellen. Het is echter belangrijk te vermelden dat als de muizen preventief bisfosfonaten kregen toegediend, dus voordat we de kankercellen inspuiten, er wel een duidelijk effect te zien was. In dat geval werden er veel minder nieuwe uitzaaiingen gevormd.

Het is dus inderdaad verstandig vrouwen met botmetastasen van borstkanker zo snel mogelijk bisfosfonaten te geven.

Uit dit onderzoek bleek dus dat we, naast bisfosfonaten, andere medicijnen nodig hebben om de groei van de tumorcellen in het bot tegen te gaan.

In aansluiting daarop, hebben in samenwerking met mijn goede vriend Prof.dr. Slobodan Vukicevic en onder bezielende leiding van mijn vaste medewerker Gabri van der Pluijm en AIO Jeroen Buijs, toen Bot Morfogenetisch Proteïne-7, kortweg BMP-7, onderzocht.

U ziet hier aan de hand van de bioluminescentie imaging dat BMP-7 de toename in het licht en dus de groei van de tumor in het bot sterk remt, met als gevolg ook een veel mindere botafbraak, wat goed zichtbaar is op de röntgenfoto's.

Wat ik u tot nu toe heb laten zien betreft allemaal 2-dimensionale opnames van het licht dat ergens in de muis geproduceerd wordt. Het zijn lichtvlekjes die groter of kleiner worden.

We kunnen echter niet zien waar het licht precies vandaan komt en hoe groot precies het signaal is op een bepaalde plek in het lichaam. Om dit wel te kunnen heb je een camerasysteem nodig die 3-dimensionele opnames kan maken.

Ik ben dan ook trots dat wij als eerste in Europa, in samenwerking met de firma Xenogen, de beschikking hebben gekregen over zo een 3-D bioluminescentie camera systeem voor kleine proefdieren. We hebben deze dan ook direct gebruikt om te kijken naar botmetastasen. Aangezien de door ons gebruikte borstkankercellen specifiek naar het skelet toe uitzaaien en daar botafbraak induceren hebben we in plaats van gewone 2-D röntgen opnames nu ook gebruik gemaakt van een CT scanner, die speciaal ontworpen is voor kleine proefdieren.

Op het volgende plaatje ziet u links de 3-D bioluminescentie opnamen vanuit acht verschillende hoeken en rechts de opnamen gemaakt door de CT scanner.

Deze verschillende imaging opnamen, verkregen door verschillende technieken, kunnen nu met elkaar worden samengevoegd tot een nieuw spectaculair 3-D filmpje dankzij de zeer intensieve en succesvolle samenwerking met de groep van het LKEB van Boudewijn Lelieveldt en collega's.

In dit filmpje ziet u nu in 3-D het skelet van een muis met in rode bollen de uitzaaiingen van borstkankercellen in het skelet. Een grote in het schouderblad, twee in de ruggenwervels en twee vlak onder de knieschijf. We zien nu dus ook duidelijk hoe groot de uitzaaiingen in werkelijkheid zijn.

Als we nu het beeld stilzetten en alleen naar het CT beeld van skelet kijken zien we ook duidelijk de gaten in het bot, aangeduid met pijlen als osteolytische haarden.

Kortom van 2-dimensionale bioluminescentie imaging gaan we nu naar 3-dimensionale multi-modaliteit imaging oftewel, naar combinaties van imaging technieken.

### **Zichtbaar maken van gen-expressie in levende muizen.**

Naast het volgen van cellen kunnen we ook genexpressie in levende muizen direct zichtbaar maken en volgen met bioluminescentie imaging.

Hiervoor koppelen we het luciferase-gen aan de aan-uit schakelaar van het te onderzoeken gen. Als vervolgens de schakelaar aan gaat, wordt niet alleen het te onderzoeken gen actief maar wordt er op die plek ook luciferase geproduceerd, dat we zichtbaar kunnen maken.

Hier ziet u een transgene muis die als hij insuline gaat maken, hij ook op die plek luciferase gaat produceren, en na injectie met luciferine ziet u daar dan het licht aangaan.

Zoals we weten, wordt insuline alleen gemaakt in de eilandjes van Langerhans in de pancreas, beter bekend als de alvleesklier. Je ziet dan ook alleen licht komen uit de muis op de plek waar de alvleesklier zit. Je ziet hier dus met eigen ogen de insulineproductie die plaatsvindt in deze muis als de suikerspiegels in het bloed omhoog gaan.

Deze transgene muizen zijn enorm interessant voor diabetes onderzoek en met name voor transplantatieonderzoek.

Zo hebben we nog veel meer van dit soort lichtgevende reporter-muizen, zoals muizen die licht gaan geven als er bloedvaten gevormd worden of als het vrouwelijke hormoon estrogeen actief is of als de muis pijn heeft. Dit maakt het onderzoek naar medicijnen dus vele malen gemakkelijker.

Belangrijk is wel te vermelden dat door deze optical imaging technologie we beduidend minder muizen hoeven te gebruiken omdat je ze in de tijd kan volgen en ze tussentijds dus niet hoeft op te offeren. Ook is het pijnbesparend omdat bijvoorbeeld bij proeven met kanker de tumoren al heel vroeg gevolgd kunnen en ze dus niet, zoals vroeger, eerst enorm groot moeten worden.

### **Fluorescentie**

Naast bioluminescentie maken we ook gebruik van fluorescentie licht.

Bij fluorescentie wordt een stof aangestraald met een bepaalde golflengte. We noemen dit excitatie licht. Hierdoor worden er elektronen aangeslagen die van energie veranderen en daarna weer terugvallen naar de grondtoestand. Bij dit proces komt fluorescentie licht vrij met een hogere golflengte dan het aangestraalde licht. We noemen dit emissie licht. Net als bij bioluminescentie maken ook allerlei exotische beestjes hier gebruik van om elkaar te vinden of om hun prooi te lokken. Wij wetenschappers hebben dat weer gebruikt om

ook hier reporter-genen mee te maken. Dat wil zeggen dat we dit soort genen ook kunnen inbouwen in cellen of beesten. Een hiervoor veel gebruikt gen is afkomstig van een kwal, het Groen Fluorescerend Proteïne (GFP), dat, u raadt het al, dus groen licht produceert. Het is fantastisch goed te gebruiken in celstudies, maar minder geschikt voor studies in levende muizen omdat de doordringbaarheid van groen licht slechts enkele millimeters is.

Gelukkig zijn er nu ook allerlei varianten van, zoals het Rode Fluorescerende Proteïne (RFP), beschikbaar die veel dieper doordringen.

Hier ziet u bijvoorbeeld een muis met een rood fluorescerende hersentumor die oplicht en dus duidelijk zichtbaar is. Daarnaast ziet u een muis met de ziekte van Alzheimer waarbij een antistof is ingespoten met daaraan de nabij-infrarood fluorescerende stof Alexafluor 760. U ziet dat de antistof zich specifiek bindt aan de Alzheimer plaques in de hersenen van deze muis. Een prachtig model dus om de vorming van Alzheimer plaques mee te bestuderen.

Zoals ik hier laat zien zijn er naast natuurlijk voorkomende fluorescerende eiwitten nu ook allerlei chemische stofjes gemaakt die na aanstralen nabij-infrarood licht uitzenden wat een nog veel grotere penetratie, tot wel 10 cm toe, door de weefsels heen heeft.

Het voordeel van deze nabij-infrarood fluorescerende stofjes is dat je ze vrij gemakkelijk kan koppelen aan antilichamen, hormonen of groeifactoren die zich vervolgens na inspuiten weer kunnen binden aan specifieke cellen of plaatsen in het lichaam die je dan dus ook zichtbaar kan maken.

Hier op het linkse plaatje zie je twee botmetastasen van borstkankercellen in het bot die luciferase bevatten en die we dus mooi zichtbaar kunnen maken met bioluminescentie imaging. Links een kleine tumor en rechts een grotere tumor. Deze tumorcellen hebben ook een zeer hoge expressie van een receptor voor de groeifactor EGF, epidermale groeifactor, die een belangrijke rol speelt bij de groei van de tumor. Als we nu aan het EGF het nabij-infrarood fluorescerende stofje CW800 koppelen en in spuiten, dan zal het EGF zich vooral binden aan de tumorcellen en zich daar ophopen. Achtenveertig uur na inspuiting zie je dan ook op het rechtse plaatje op exact dezelfde plaats als waar het bioluminescentie licht vandaan kwam nu fluorescerend licht vandaan komen.

Dit brengt mij tot het slot van mijn verhaal waarbij ik nog wil laten zien wat de optical imaging te bieden heeft voor de kliniek.

Er is al een Nabij-InfraRood Fluorescentie Borstscanner op de markt voor detectie van borstkanker bij vrouwen. Zoals u kunt zien loopt de vrouw het trapje op gaat liggen met haar borst in het detectiegat waar een aantal detectoren in zitten. De borst wordt dan beschenen met Nabij-InfraRood licht en als er een tumor aanwezig is zal op die plek het licht worden ingevangen wat als rode plek wordt weergegeven.

U ziet in dit plaatje links de gezonde rechter borst waar het licht overal mooi doorheen gaat dat wordt weergegeven als blauwe kleur. Rechts ziet u duidelijk twee rode vlekken

die afkomstig zijn van de tumortjes in de borst. De onderste kleine tumor was niet met de standaard röntgenfoto zichtbaar te maken. De tumoren zijn succesvol verwijderd en de vrouw is genezen omdat ze verder geen uitzaaiingen had. Kortom zien is genezen.

Het zal voor u duidelijk zijn dat we bij mensen niet allerlei lichtgevende genen kunnen bouwen, zoals we dat bij de muis wel kunnen. We gaan namelijk gebruik maken van de al eerder genoemde nieuw ontwikkelde nabij-infrarood fluorescerende stofjes.

U ziet hier een voorbeeld bij een muis, maar u moet zich voorstellen dat we ditzelfde zeer binnenkort gaan doen bij mensen.

We koppelen een nabij-infrarood fluorescerend stofje aan antilichamen die specifiek bepaalde kankercellen kunnen herkennen. Vervolgens zullen we die bij een patiënt (in dit geval de muis) 24 tot 48 uur voor de operatie inspuiten. Als de chirurg vervolgens de patiënt openmaakt, zal hij met de nabij-infrarode camera exact kunnen zien waar de tumor zit omdat die op zal lichten. De chirurg kan vervolgens nauwkeurig de lichtgevende tumor en de mogelijk aanwezige aangedane lymfeklieren, zoals we die hier op het plaatje bij de muis zien, wegsnijden totdat al het licht verdwenen is.

### **Opnieuw zien is genezen.**

Tot slot een andere belangrijke toepassing, namelijk het opsporen van de poortwachter lymfeklier. Wat wordt hier mee bedoeld?

Als tumorcellen van een primaire tumor uitzaaien doen ze dat meestal via de afvoerende lymfevaten en zullen zich dus een lange tijd ophopen in de eerst volgende, dichtstbijzijnde, lymfeklier. Deze fungeert dan als een soort poortwachter en wordt daarom dan ook zo genoemd. Het is gebleken dat, als we de poortwachter lymfeklier weg halen bij het vaststellen van een progressieve tumor, zoals bijvoorbeeld bij borstkanker, de overlevingskans van vrouwen enorm toeneemt. Het opsporen en verwijderen is dus van groot klinisch belang.

Zoals u in het laatste filmpje kunt zien spuit de chirurg vlakbij een zeer kwaadaardige huidtumor een klinisch goedgekeurd nabij-infrarood fluorescerend stofje in dat zich via de lymfevaten verspreid en zich vervolgens ophoopt in de lymfeklier. Met een zeer gevoelig camerasysteem kunnen we dit zichtbaar maken en de chirurg zal op de plek waar het licht zich ophoopt een incisie maken en het lichtgevende bolletje, de lymfknoop, verwijderen.

Ik hoop dat ik u heb kunnen overtuigen dat zien niet alleen geloven is, maar dat zien nu ook genezen is.

Deze nieuwe optische technieken betekenen een revolutie in de chirurgische oncologie en ik ben dan ook blij dat wij een goede samenwerking hebben met onze chirurgische oncologiegroep met Alexander Vahrmeijer en onder leiding van Cock van der Velde. Ik wil de raad van bestuur dan ook danken dat ze ons hiervoor een start- en

overbruggingssubsidie hebben gegeven, die nu voortgezet zal worden in de vorm van een grote CTMM subsidie van de overheid.

### **Tenslotte.**

Zoals ik u in het begin van mijn verhaal heb laten zien, kunnen we met name door de enorme ontwikkeling van de imaging op cardiovasculair gebied nu levens redden die dertig jaar geleden niet gered konden worden. Ik hoop dat door ons onderzoek, en mijn leeropdracht op het gebied van botziekten en de molecular imaging, we niet pas over weer dertig jaar, maar al over vijf tot tien jaar kunnen vaststellen dat we dan ook levens kunnen redden die nu nog niet gered kunnen worden.

Ik wil graag iedereen danken die in de loop der jaren heeft bijgedragen aan het onderzoek. Het zijn er te veel om op te noemen maar ik wil er toch een aantal in het bijzonder noemen. Ten eerste mijn leermeesters Nel Erlee en Olav Bijvoet en natuurlijk mijn goede vriend en klinisch hoofd van onze botgroep Socrates Papapoulos. Jullie hebben altijd vertrouwen in mij gehad en enorm veel vrijheid gegeven binnen het onderzoek. Mijn grote dank hiervoor en ik hoop en denk dat ik jullie vertrouwen nooit heb beschaamd. Ook Gabri van der Pluijm, mijn partner in crime op de afdeling, wil ik enorm danken voor zijn inzet en creativiteit, met name op het gebied van het onderzoek naar botmetastasen. Het was niet altijd even gemakkelijk, maar we hebben samen iets moois neergezet en waardering gekregen voor ons werk. Jij hebt inmiddels ook je eigen groep op de Urologie en ik hoop nog lang met je samen te mogen werken. Ermond van Beek, door jouw doorzettingsvermogen hebben we het werkingsmechanisme van bisfosonaten opgelost. Rutger van Bezooijen, door jouw fantastische inzet weten we nu hoe sclerostin werkt en zal het hopelijk snel leiden tot een nieuw medicijn voor osteoporose. Peter ten Dijke, jouw bijdrage op het gebied van de signaaltransductie bij het sclerosteoseonderzoek was enorm belangrijk en we hebben inmiddels een jarenlange vruchtbare samenwerking, ook op het gebied van de botmetastasen. Marcel Karperien, jouw briljante moleculaire en celbiologische kennis waren van onschatbare waarde in ons onderzoek naar bot- en kraakbeenvorming. Helaas voor ons ben je vertrokken naar de TU Twente, maar dat opent ook weer nieuwe mogelijkheden voor vruchtbare samenwerking. Karien, dank voor je volhardende en mooie werk aan onze stamcellen.

Ook wil ik alle AIO's, studenten, de mensen van de proefdieren en onze analisten, waar ik altijd op kan steunen, danken.

Collega's van het LKEB, met name Boudewijn Lelieveldt, Jouke Dijkstra en Hans Reiber, dank voor de enorm goede samenwerking. Zonder jullie input had ik nooit van die mooie filmpjes kunnen laten zien.

Ook de collega's van de chirurgische oncologie, Cock van der Velde en Alex Vahrmeijer; we gaan nog mooie tijden tegemoet.

Bijzondere dank ook aan Eric Kaijzel, mijn rechterhand op het gebied van de Molecular Imaging. Jij hebt enorm veel werk verzet, met name bij het meehelpen coördineren van al

ons imagingonderzoek en onze EU projecten en bij het maken van allerlei “fancy” gen-reporter constructen. En niet te vergeten mijn linkerhand op dit gebied, Ivo Que; zonder jou zou er geen Molecular Imaging bestaan want jij weet niet alleen alles van dierexperimenten, maar nog meer van alle imagingsystemen. Hans Romijn jou wil ik danken voor het feit dat jij van onze afdeling een van de beste afdelingen van het LUMC hebt gemaakt; je bent een groot voorbeeld van hoe je een fantastische brug kan slaan tussen klinisch en preklinisch laboratoriumonderzoek.

Special thanks to me dear friends and colleagues from our European networks of excellence EMIL and DIMI, who are present here today. I am proud that we now have turned these networks into the European Society for Molecular Imaging. Mathias, I am very happy that we just got a big grant from the Volkswagenstiftung for our collaborative work on imaging of neuronal stem cell differentiation for treatment of stroke and other brain diseases.

Het college van bestuur van de universiteit en de raad van bestuur wil ik in het bijzonder danken voor het in mij gestelde vertrouwen.

Tot slot natuurlijk mijn aller-dierbaarste gezin; mijn fantastische jongens Steef, Jasper en Martijn, waar ik bijzonder trots op ben en last but not least mijn vrouw Marion; jij hebt altijd moeten concurreren met mijn ander grote liefde, de wetenschap, maar jij wint het toch altijd met ruime voorsprong. Je hebt me vaak moeten missen en staat altijd klaar voor ons. Hiervoor zouden we eens wat meer onze waardering moeten laten blijken. Maar voor is mij in ieder geval duidelijk dat ik hier niet zou hebben gestaan zonder jouw steun.

Ik heb gezegd.

---