

University of Groningen

**Regulation of hemopoietic cell production. In vivo manipulation by hemopoietic growth factors and cytotoxic drugs.**

Haan, Gerald de

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1995

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Haan, G. D. (1995). *Regulation of hemopoietic cell production. In vivo manipulation by hemopoietic growth factors and cytotoxic drugs.* s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**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.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

### 13.1. Inleiding; waar dit proefschrift over gaat...

Het doel van de studies die zijn beschreven in dit proefschrift is om een beter inzicht te verkrijgen in de manier waarop de bloedcelvorming (hemopoïese) plaats vindt. Bloed bestaat voor iets meer dan de helft uit vocht (plasma), dat er niet alleen voor zorgt dat het bloed op vrijwel elke plaats in het lichaam kan doordringen, maar tevens dient om allerlei oplosbare stoffen, die voor het lichaam noodzakelijk zijn, te vervoeren. Iets minder dan de helft van het totale bloedvolume bestaat uit bloedcellen. Deze cellen bestaan uit verschillende soorten, de bloedplaatjes, de rode en de witte bloedcellen, elk met een eigen karakteristieke functie en vorm. Bloedplaatjes (ook wel trombocyten genoemd) spelen een belangrijke rol bij de stolling van bloed en het afsluiten van de bloedvaten na een beschadiging. Zonder bloedplaatjes zou binnen zeer korte tijd na een trauma een levensbedreigend bloedverlies op treden. De rode bloedcellen (ook wel erythrocyten genoemd) zorgen voornamelijk voor het transport van zuurstof vanuit de longen naar alle cellen van het lichaam. Een tekort aan rode bloedcellen leidt, van al dan niet ernstige vermoeidheid, uiteindelijk tot de dood. De overige cellen in het bloed worden gezamenlijk witte bloedcellen (ook wel leukocyten) genoemd, omdat zij, in tegenstelling tot rode bloedcellen, geen hemoglobine in zich hebben, dat zorg draagt voor de binding van zuurstof in de rode bloedcel en dat de rode bloedcel zijn karakteristieke kleur geeft. In feite is de verzamelnaam "witte bloedcel" een beetje misleidend, omdat het hier een heel scala aan verschillende celtypen betreft, elk met een heel specifieke werking. Wat alle witte bloedcellen gemeenschappelijk hebben echter is, dat hun voornaamste rol bestaat uit het elimineren van lichaamsvreemde indringers. De witte bloedcellen zorgen gezamenlijk voor de afweer van het lichaam, maar ieder celtype heeft daarin een eigen rol. Macrofagen zijn grote cellen die lichaamsvreemde deeltjes omsluiten en opnemen. Granulocyten zijn cellen die in zich kleine bolletjes (granula) hebben, gevuld met verschillende voor indringende micro-organismen (b.v. bacteriën, parasieten) giftige stoffen, en die vrij laten als ze met een dergelijke indringer in aanraking komen. Dat deze stoffen ook voor de mens zelf niet prettig zijn blijkt tijdens ontstekingen. Lymfocyten tenslotte spelen een belangrijke rol bij de herkenning en ontdekking van indringende micro-organismen. Bepaalde lymfocyten maken anti-lichamen tegen zo'n beetje alles wat ze niet kennen. Als micro-organismen bedekt zijn met anti-lichamen, worden ze benaderd door andere witte bloedcellen waardoor ze uiteindelijk gedood worden. Een tekort aan één of meerdere witte bloedceltypen leidt tot een verminderde weerstand tegen allerhande infecties.

Het is dus duidelijk dat het voor het menselijke, maar ook dierlijke, lichaam noodzakelijk is altijd genoeg cellen van ieder bloedceltype te hebben. Het probleem is echter dat de meeste bloedcellen maar een beperkte levensduur hebben. Sommige lymfocyten leven misschien wel levenslang, maar de rode bloedcellen leven maar ongeveer 120 dagen, bloedplaatjes ongeveer 9 dagen en granulocyten leven in de mens maar 1 tot 2 dagen. Dit betekent dat er iedere dag een enorme hoeveelheid bloedcellen aangemaakt moet worden. Sommige berekeningen laten zien dat er in de mens ongeveer 1 miljard rode en 2 miljard witte bloedcellen per dag gemaakt zouden moeten worden. Deze aanmaak vindt in de mens voornamelijk plaats in het beenmerg en gaat, als alles goed is, ons hele

leven door. De stu  
aanmaak van versc  
essentiële aspecten  
Voordat hier ingega  
beeld geschetst wor

Alle verschi  
primitieve stamcelle  
uiteen van één tot e  
de stamcellen erg ze  
gen ontstaan uiteind  
tussen de allervroeg  
celdelingen verlopen  
1000 biljoen rijpe  
bloedcelvorming is  
celproliferatie. Een  
alleen veel cellen p  
uitrijpen, ofwel diff  
wordt gesproken va  
moet doorgaan, is h  
bestaan verschillende  
langrijkste veronder  
stamcel deelt, één v  
dat de andere dochte  
len. De aanmaak v  
wankele evenwicht tr  
celproductie bepaalt;  
en dus productie, te  
dus onbruikbare cello

Hoe dit ever  
normale bloedcelvori  
onderzoek echter ge  
achtige groeifactore  
bloedcellen beïnvloe  
Voorzover deze stim  
hemopoïetische groe  
verschillende bedrijv  
zijn om op grote sch  
de aanmaak van één  
EPO), dat de aanma  
effekten op meer b  
achtige" cellen. Aan  
tekort van één of m

leven door. De studies, die zijn beschreven in dit proefschrift, hadden tot doel om deze aanmaak van verschillende soorten bloedcellen te bestuderen in de muis. De meeste essentiële aspecten van de bloedcelvorming in de muis en de mens verlopen identiek. Voordat hier ingegaan kan worden op het bespreken van de resultaten, zal eerst een beter beeld geschetst worden van enige basale kenmerken van de aanmaak van bloedcellen.

Alle verschillende soorten bloedcellen zijn de nakomelingen van zogenaamde primitieve stamcellen. In het beenmerg zijn de stamcellen erg zeldzaam; schattingen lopen uiteen van één tot enkele stamcellen per honderdduizend andere beenmergcellen. Hoewel de stamcellen erg zeldzaam zijn, zijn ze in staat vele malen te delen. Door deze celdelingen ontstaan uiteindelijk bloedcellen van alle verschillende celtypen. Er wordt geschat dat tussen de allervroegste stamcel en zijn uiteindelijke nakomelingen in het bloed 50 tot 80 celdelingen verlopen. Vijftig celdelingen zou betekenen dat één stamcel in staat is om 1000 biljoen rijpe bloedcellen te maken. Eén van de belangrijkste kenmerken van de bloedcelvorming is daarmee reeds genoemd: de vele celdelingen, ook wel genoemd celproliferatie. Een ander aspect betreft de uitrijping van de cellen. Een stamcel moet niet alleen veel cellen produceren (hoge proliferatie) maar ook moeten deze cellen volledig uitrijpen, ofwel differentiëren. Als stamcellen alleen maar delen en niet meer uitrijpen, wordt gesproken van een leukemie. Omdat de bloedcelvorming gedurende het hele leven moet doorgaan, is het van groot belang dat er altijd voldoende stamcellen over blijven. Er bestaan verschillende theorieën over hoe dit verwezenlijkt zou worden, waarvan de belangrijkste veronderstelt dat stamcellen zichzelf vernieuwen. Dit betekent, dat als een stamcel deelt, één van de beide dochtercellen volledig identiek is aan de stamcel zelf en dat de andere dochtercel uiteindelijk zorg draagt voor de produktie van de vele bloedcellen. De aanmaak van bloedcellen is uiteindelijk voornamelijk een regulering van het wankele evenwicht tussen de celproliferatie en celdifferentiatie. Het is dit evenwicht dat de celproduktie bepaalt; een versnelde uitrijping leidt vaak tot een verminderd aantal delingen en dus produktie, terwijl een te hoge proliferatie gepaard kan gaan met teveel onrijpe en dus onbruikbare cellen.

Hoe dit evenwicht tussen differentiatie en proliferatie gehandhaafd bleef in de normale bloedcelvorming is lange tijd een raadsel geweest. In de afgelopen tien jaar is uit onderzoek echter gebleken dat het lichaam in staat is tot het maken van vele hormoonachtige groeifactoren, die meer of minder specifiek de aanmaak van de verschillende bloedcellen beïnvloeden. Er zijn nu zo'n dertig van deze lichaamseigen stoffen bekend. Voorzover deze stimulerende effecten op de bloedcelvorming hebben, worden ze ook wel hemopoietische groeifactoren genoemd. Deze groeifactoren worden tegenwoordig door verschillende bedrijven buiten het lichaam om gemaakt. Dit betekent dat ze nu voorhanden zijn om op grote schaal mee te experimenteren. Sommige groeifactoren stimuleren slechts de aanmaak van één type bloedcel. Een voorbeeld hiervan is erythropoetine (afgekort tot EPO), dat de aanmaak van de rode bloedcellen bevordert. Andere groeifactoren hebben effecten op meer bloedceltypen en werken daarom waarschijnlijk op meer "stamcelachtige" cellen. Aangezien er vele situaties bestaan waarin er in het menselijk lichaam een tekort van één of meerdere bloedceltypen is, wordt vrij algemeen gedacht dat groeifakto-

ren een belangrijke rol kunnen spelen in het weer op peil brengen van een bepaald celtyp. De grootste groep patiënten, die mogelijk het meest voordeel zou kunnen hebben van een behandeling met groeifactoren, zijn kankerpatiënten. Vanwege hun ziekte ondergaan deze patiënten een chemotherapie of een bestraling. Deze ingrepen hebben als doel snelde- lende tumorweefsel te doden. Helaas bestaan er in het menselijk lichaam ook andere weefsels die snel delen en daardoor zeer te lijden hebben van de anti-tumor behandeling. Eén van de belangrijkste van dergelijke weefsels is het beenmerg, waar, zoals hierboven uiteengezet, bij de aanmaak van bloedcellen veel celdelingen plaats hebben. Kankerpa- tiënten, die behandeld worden met chemotherapie of bestraling, hebben dan ook immer een tijdelijk tekort aan bloedcellen, voornamelijk bloedplaatjes en witte bloedcellen. Als dit maar even duurt is er niet zoveel aan de hand, maar vaak is de periode van een tekort aan bloedcellen te lang en moet de anti-tumor behandeling worden gestaakt. Dit leidt tot een (gewenst) herstel van de bloedcelvorming, maar helaas ook vaak tot een (niet gewenst) terugkeren van tumorcellen. Gehoopt en gedacht wordt, dat hemopoietische groeifactoren de aanmaak van bloedcellen in deze situatie kunnen stimuleren zodat er eerder weer met de anti-tumor behandeling begonnen kan worden. Hoewel er in dit opzicht zeker enkele successen beschreven zijn, lijkt het alsof de werking van de meeste groeifactoren en combinaties van groeifactoren niet optimaal zijn benut. Het is waarschijnlijk dat dit voortkomt uit een onvoldoende begrip over de exacte werkingsmechanismen van groeifak- toren. Groeifactoren zouden bijvoorbeeld langzaam delende cellen sneller kunnen laten delen. Ze zouden ervoor kunnen zorgen dat de rijping van onrijpe bloedcellen versneld of juist vertraagd wordt. Ze zouden ervoor kunnen zorgen dat onrijpe cellen niet voortijdig afsterven. Het doel van dit proefschrift is om enige van deze werkingsmechanismen in kaart te brengen en vervolgens van deze kennis gebruik te maken in enkele proeven, waarin de situatie, zoals bovenbeschreven voor kankerpatiënten, ten dele nagebootst wordt.

### 13.2. Resultaten; ...en wat het heeft opgeleverd.

In dit proefschrift wordt de aanmaak van witte bloedcellen bestudeerd in de hoofd- stukken 4, 5 en 6. In de hoofdstukken 7, 8 en 9 wordt de aanmaak van rode bloedcellen onderzocht en tot slot wordt in de hoofdstukken 10 en 11 beschreven, hoe de bijwerkingen van bepaalde soorten chemotherapie bestreden kan worden door hemopoietische groeifak- toren op alternatieve manieren toe te dienen.

Het eerste doel was om te proberen vast te stellen hoe de aanmaak van witte bloed- cellen verloopt in de muis. Hoofdstukken 4, 5 en 6 gaan hierover. Zoals vermeld vindt deze aanmaak normaal alleen in het beenmerg plaats. Al snel bleek dat een belangrijk aspekt van een verhoogde witte bloedcelvorming het onderdrukken van de rode bloedcel- vorming is (hoofdstuk 4). De aanmaak van rode bloedcellen wordt verdreven uit het beenmerg naar de milt. Dit bleek in een vervolgstudie nog duidelijker, toen de aanmaak van bloedcellen bestudeerd werd in muizen, waarvan de milt tevoren verwijderd was (hoofdstuk 6). Klaarblijkelijk bestaat er een balans tussen de aanmaak van rode- en witte cellen in het beenmerg. Een overproductie van de één leidt tot een verminderde productie

van de ander. In e  
in de milt terecht  
het ware de wede  
belangrijke rol in  
celtypen. Interest  
in het bloed gevon  
als vervanging van  
komen, wat ze da  
gereert dat het van  
meer over te weter

Toen gevon  
bloedcellen beïnvlo  
derde tijdens een  
toegediend werd d  
effekt te hebben (  
beïnvloed werden.  
van bloedcellen no  
schijnlijk via migra  
lende typen stamc  
gedacht wordt dat  
ringen kunnen optr

In de hoofd  
In hoofdstuk 7 wor  
kelijke groeifactor,  
een voortijdige doo  
faktor cellen snelle  
de experimenten, d  
doet delen, is het g  
sneldelende cellen)  
gelijktijdig gebruik  
proeven beschreven  
Aangetoond wordt  
meer voorlopercelle  
voorlopercellen ver  
ming plaats.

In de hoofd  
men toegepast in  
werden behandeld  
bloedcelvorming do  
toedienen van groe  
gekozen voor twee  
en chemotherapie g

van de ander. In een normale muis kunnen stamcellen echter uit het beenmerg loslaten en in de milt terecht komen waar ze volledig uitgroeien. Deze migratie van cellen omzeilt als het ware de wederzijdse remming van witte- en rode bloedcelvorming en speelt zo een belangrijke rol in het in stand houden van de juiste balans tussen de verschillende bloedceltypen. Interessant genoeg worden ook in de mens in sommige situaties veel stamcellen in het bloed gevonden. Dit kunnen er zo veel zijn dat deze cellen gebruikt kunnen worden als vervanging van een beenmergtransplantaat. Waarom deze cellen in het bloed voorkomen, wat ze daar doen en waar ze naar toe gaan is onbekend, maar onze studie suggereert dat het van belang kan zijn voor een juist beeld van de bloedcelvorming om hier meer over te weten te komen.

Toen gevonden werd dat de aanmaak van witte bloedcellen de aanmaak van rode bloedcellen beïnvloedt, is vervolgens onderzocht of de aanmaak van stamcellen ook veranderde tijdens een verhoogde witte bloedcelvorming (hoofdstuk 5). Toen een groeifactor toegediend werd die geacht wordt uitsluitend op de aanmaak van witte bloedcellen een effect te hebben (G-CSF), bleek dat ook heel primitieve, vroege stamcellen zeer sterk beïnvloed werden. Vooral in het beenmerg verdwenen deze, voor de continue aanmaak van bloedcellen noodzakelijke cellen, vrijwel volledig. Deze cellen kwamen, zeer waarschijnlijk via migratie door het bloed, terecht in de milt. Het bestuderen van de verschillende typen stamcellen liet zien dat, hoewel stamcellen niet vaak delen en algemeen gedacht wordt dat deze cellen zeer stabiel in aantal en gedrag zijn, er toch grote veranderingen kunnen optreden.

In de hoofdstukken 7, 8 en 9 werd de aanmaak van de rode bloedcellen bestudeerd. In hoofdstuk 7 wordt aangetoond, dat de voor de aanmaak van de rode bloedcel noodzakelijke groeifactor, EPO, waarschijnlijk alleen maar voorkomt dat onrijpe voorlopercellen een voortijdige dood sterven in het merg. Er kon niet worden aangetoond dat deze groeifactor cellen sneller deed delen of eerder deed uitrijpen. Dit gegeven is van belang voor de experimenten, die beschreven zijn in hoofdstuk 10; als een groeifactor cellen sneller doet delen, is het gelijktijdig gebruik van deze factor en een chemotherapie (die werkt op sneldelende cellen) niet wenselijk. In hoofdstuk 10 wordt aangetoond dat EPO heel goed gelijktijdig gebruikt kan worden met chemotherapie. In de hoofdstukken 8 en 9 worden proeven beschreven waarin de aanmaak van rode bloedcellen optimaal wordt gestimuleerd. Aangetoond wordt dat als er stimulatie plaats vindt van vroege stamcellen, er tijdelijk meer voorlopercellen ontstaan van de witte- en rode bloedcel. Als vervolgens de rode voorlopercellen verder gestimuleerd worden met EPO, vindt optimale rode bloedcelvorming plaats.

In de hoofdstukken 10 en 11 worden enkele van de gevonden werkingsmechanismen toegepast in situaties, die lijken op de behandeling van kankerpatiënten: muizen werden behandeld met chemotherapie en groeifactoren met als doel de aantasting van de bloedcelvorming door de chemotherapie (zoveel mogelijk) te voorkomen. In plaats van het toedienen van groeifactoren ná een chemokuur, zoals dat bij patiënten gebeurt, werd gekozen voor twee alternatieve behandelingen. Eerst (hoofdstuk 10) werden groeifactoren en chemotherapie gelijktijdig toegediend. Zoals bovenstaand vermeld, was het uitgangs-

punt, dat sommige groeifactoren cellen niet sneller doen laten delen, maar dat deze alleen voorkomen dat cellen vroegtijdig afsterven. Een gelijktijdige behandeling met groeifactoren en chemotherapie zou dan niet noodzakelijkerwijs slecht hoeven te zijn. In hoofdstuk 10 wordt aangetoond dat dit inderdaad het geval is en dat de aanmaak van de bloedcelvorming in stand gehouden kon worden tijdens een chemotherapie. Als laatste proef (hoofdstuk 11) werden groeifactoren toegediend vóórdat met een chemotherapie werd begonnen. Het idee hierachter was om door een groeifactorbehandeling eerst te zorgen voor meer stamcellen. Als vervolgens gestopt zou worden met de groeifactortherapie worden deze stamcellen niet meer gestimuleerd en omdat het er veel zijn zouden ze langzamer gaan delen (dat worden ze verondersteld te doen om hun aantal weer te normaliseren). Als ze langzamer delen zijn ze minder gevoelig voor een chemotherapie, die immers vooral delende cellen doodt. Toen deze gedachtengang getest werd, bleek deze strategie prima te werken. Muizen die voorbehandeld waren hadden veel minder last van de chemokuur en herstelden sneller, zodat ze weer eerder met een volgende kuur konden beginnen.

Samenvattend kan gesteld worden, dat de fundamentele kennis van de aanmaak van bloedcellen en speciaal van het gedrag van stamcellen tijdens deze aanmaak, door de beschreven experimenten verbeterd is. Dit leidde er onder andere toe dat we in staat zijn geweest om muizen te beschermen tegen een chemokuur met op een alternatieve manier toegediende groeifactoren. In hoeverre deze manier of het principe van de methode toepasbaar is bij de behandeling van kankerpatiënten zal moeten blijken uit vervolgonderzoek, maar duidelijk is wel dat veel kennis omtrent de werkingsmechanismen van groeifactoren nog ontbreekt. Deze kennis zal echter onontbeerlijk blijken te zijn voor een optimaal gebruik van groeifactoren bij de behandeling van patiënten.

## Publication

### Papers

1. de Haan G, I...  
cyte-colony  
marrow eryt...  
20:600-605.
2. de Haan G,  
dependent eff...  
British Journa...
3. Nijhof W, d...  
erythropoiesis...
4. de Haan G,  
inhibition of...  
granulocyte c...  
interactions a...
5. de Haan G,  
cell factor ac...  
poiesis. Expe...
6. de Haan, En...  
prolonged et...  
growth factor...
7. Nijhof W, D...  
erythropoietin...
8. de Haan, En...  
interleukin-11...  
regulation of...
9. de Haan, En...  
murine hemo...  
blood cell pro...
10. de Haan, Dor...  
primitive hem...  
mice protects

### Abstracts

1. de Haan G, I...  
and granulop...  
tol.20:772a. 1...  
Meeting, Aug...
2. Nijhof W, D...  
normal eryth...