

Nederlandse Samenvatting

Er zijn verschillende therapieën beschikbaar voor patiënten met nierfalen. Niertransplantatie kan uiteindelijk succesvol blijken, maar voorafgaand is meestal een andere nierfunctie vervangende therapie noodzakelijk, te weten dialyse. Er zijn twee vormen van dialyse, namelijk hemodialyse (spoelen via het bloed) en peritoneale dialyse. Peritoneale dialyse is letterlijk spoelen via de buikholte en wordt in Nederland toegepast bij ongeveer 20% van de dialyse patiënten. Tijdens deze therapie wordt het buikvlies gebruikt als filter om het bloed van afvalstoffen te zuiveren. Bij deze patiënten wordt een permanente katheter geplaatst in de buikholte waardoor 1 tot 3 liter dialysevloeistof in de buikholte gebracht kan worden. Nadat deze vloeistof gedurende een aantal uren in de buikholte is verbleven wordt de dialysevloeistof met behulp van de zwaartekracht gedraineerd en vervangen door nieuwe dialysevloeistof. Gedurende de periode dat de dialysevloeistof in de buikholte aanwezig is worden vanuit het bloed afvalstoffen naar de vloeistof getransporteerd, die normaal door de nieren worden uitgescheiden. Tegelijkertijd wordt er vocht vanuit het lichaam onttrokken. Dit proces wordt ook wel ultrafiltratie genoemd en gebeurt op basis van een osmotische gradiënt (in de meeste gevallen is dit glucose). Peritoneale dialyse heeft als voordeel dat het door de patiënt zelf thuis kan worden uitgevoerd en bovendien is het een geleidelijk en continu proces, in tegenstelling tot de hemodialyse. Daarnaast is deze techniek goedkoper, waardoor bijvoorbeeld in Hong Kong 80% van de patiënten wordt gespoeld met peritoneale dialyse.

Er is echter aangetoond dat langdurige en continue blootstelling aan de dialysevloeistof schade aan de buikholte en de buikvliezen veroorzaakt. In **hoofdstuk 1** wordt omschreven dat bekend is dat de glucose die als osmotisch gradiënt aan de dialysevloeistof wordt toegevoegd, de glucose afbraak producten, de hoeveelheid vloeistof in de buikholte en de aanwezigheid van de katheter bijdragen aan de schade die ontstaat in de buikholte. Deze factoren activeren ontstekingscellen, maar zijn daarnaast ook betrokken bij het ontstaan van verdikkingen in de buikwand (fibrosing) en induceren de ontwikkeling van nieuwe bloedvaten (angiogenese). Door deze processen kan er minder uitwisseling van afvalstoffen en vocht plaatsvinden wat uiteindelijk leidt tot ultrafiltratie verlies en ophoping van afvalstoffen. Peritoneale dialyse is op dat moment geen toereikende techniek meer waardoor de patiënt moet overstappen op hemodialyse.

In dit proefschrift hebben wij naar verschillende mogelijkheden gekeken om schade aan de buikholte te kunnen voorkomen. Dit hebben we gedaan door in een preklinisch rattenmodel te kijken naar de effecten van verschillende medicijnen (**hoofdstuk 2-6**), te onderzoeken wat er rondom de bloedvaten gebeurt tijdens een ontsteking (**hoofdstuk 7**) en te zoeken naar indicatoren die in een vroeg stadium kunnen aangeven wat er zich in de buikholte afspeelt (**hoofdstuk 8 en 9**).

Als eerste hebben wij in **hoofdstuk 2** gekeken naar de effecten van heparine op de schade in de buikholte. Het is bekend dat heparine, naast zijn antistollings capaciteit, onder bepaalde omstandigheden ontstekingsremmende activiteiten heeft. Over deze ontstekingsremmende eigenschappen tijdens peritoneale dialyse is echter nog geen duidelijkheid. Daarom hebben wij in een rattenstudie heparine toegevoegd aan de dialyse vloeistof en de dieren 5 weken lang dagelijks behandeld. Uit deze studie is gebleken dat het toevoegen van heparine de ontstekingsprocessen nauwelijks kan remmen en de schade aan de buikvlies niet kan voorkomen.

In **hoofdstuk 3** hebben wij ons geconcentreerd op het voorkomen van de verdikking van de buikwand (matrixvorming/fibrose). Een verdikte buikwand kan moeilijker afvalstoffen en vocht transporteren waardoor de techniek minder goed werkt. Fibrose ontstaat onder andere doordat de cellen die de buikholte bekleden (mesothel cellen) veranderen in matrixvormende cellen (fibroblasten). Het veranderen van mesothel cellen in fibroblasten heet EMT. In hoofdstuk 3 hebben wij op celniveau laten zien dat een bepaald eiwit (bone morphogenic protein-7, BMP-7) het omvormen van mesothel cellen naar fibroblasten kan voorkomen. In het rattenmodel bleek inderdaad dat er door de toevoeging van het eiwit BMP-7 aan de dialysevloeistof minder fibroblasten aanwezig zijn en dat fibrose voor een groot deel voorkomen wordt. Daarnaast trad er minder bloedvatvorming op in de behandelde dieren. Uit deze studie is gebleken dat hoe minder EMT er plaats vindt hoe minder fibrose en angiogenese er optreedt. Dit suggereert dat het voorkomen van EMT niet alleen belangrijk is voor het verminderen van verdikkingen in de buikwand maar ook voor de preventie van de ontwikkeling van nieuwe bloedvaten.

De ontwikkeling van nieuwe bloedvaten is naast de ontstekingsprocessen en fibrosering een van de problemen tijdens peritoneale dialyse. Doordat er meer bloedvaten zijn wordt de glucose uit de dialysevloeistof sneller door het lichaam opgenomen. Daardoor verdwijnt de osmotische gradiënt te snel en is er weinig tijd om voldoende vocht aan het lichaam te onttrekken. Om dit proces te voorkomen hebben wij in **hoofdstuk 4** gekeken naar de effecten van de ontstekingsremmer

Celecoxib in ons ratten dialyse model. Het is bekend dat Celecoxib in bepaalde modellen naast het remmen van ontstekingsprocessen ook angiogenese kan voorkomen. Uit onze studie bleek echter dat de ontstekingsparameters niet werden beïnvloed door de behandeling met Celecoxib. Daarentegen kon angiogenese wel voorkomen worden en trad er zelfs minder fibrosering op waardoor de ultrafiltratie capaciteit behouden bleef. Dit zijn veel belovende resultaten en op grond hiervan is recentelijk een klinische pilot studie gestart.

Doordat Celecoxib in onze rattenstudie effect had op zowel angiogenese als op fibrose konden we aan de hand van deze studie niet identificeren welk van deze twee processen hoofdzakelijk de verslechtering van de ultrafiltratie veroorzaakt. Daarom hebben wij een andere rattenstudie uitgevoerd waarin we alleen de bloedvatvorming hebben geremd. In **hoofdstuk 5** beschrijven we dat de angiogenese remmer Sunitinib de vorming van nieuwe bloedvaten geheel kan tegengaan maar dat dit niet leidt tot een verbetering van de ultrafiltratie capaciteit. Daarnaast heeft deze medicatie bijverschijnselen zoals gewichtsverlies, diarree en misselijkheid waardoor deze therapie minder geschikt is om in de kliniek toe te passen.

Uit onze studies blijkt dat ultrafiltratie verlies moeilijk is te voorkomen en dat het remmen van een enkel proces alleen niet voldoende is om de ultrafiltratie capaciteit te behouden. Daarom hebben wij vervolgens gezocht naar middelen die meerdere processen kunnen beïnvloeden. Een van die middelen is vitamine D. Mensen krijgen vitamine D binnen via het zonlicht en door middel van het eten van bepaalde voedingsmiddelen. Maar om de gunstige effecten van vitamine D te verkrijgen moet het vitamine D geactiveerd worden. In gezonde personen vindt dit plaats in de nieren. Patiënten met nierfalen hebben daarom te lage vitamine D spiegels en worden daarom behandeld met actief vitamine D (zoals bijvoorbeeld Paricalcitol). In **hoofdstuk 6** hebben wij laten zien dat behandeling met Paricalcitol tijdens peritoneale dialyse zowel fibrose als angiogenese kan voorkomen en bovendien ontstekingsprocessen kan remmen waardoor de ultrafiltratie capaciteit in stand gehouden kon worden. Deze behandeling lijkt daarom veel belovend voor toekomstige studies in patiënten.

Het vinden van medicatie die de schade aan de buikholte kan voorkomen is belangrijk, maar daarnaast is het tevens van belang om precies te weten wat er zich in de buikholte afspeelt.

In **hoofdstuk 7** wordt een studie beschreven waarin wij een lokaal afweer mechanisme hebben bestudeerd. Met behulp van videomicroscopie hebben we de interactie tussen bepaalde ontstekingscellen (neutrofielen) en de binnenbekleding

van bloedvaten (endotheelcellen) bestudeerd. Tijdens een ontsteking van de buikholte (peritonitis) worden er via de bloedbaan veel neutrofielen aangevoerd die op de plek van de ontsteking vastplakken aan de vaatwand en de bloedbaan verlaten. Het blijkt dat het aantal neutrofielen dat uit de bloedbaan treedt afhankelijk is van het type vloeistof en bij voorkeur optreedt in nieuw gevormde bloedvaten. Bij vloeistoffen die meer glucose afbraak producten bevatten treden er meer neutrofielen uit de bloedbaan en worden er meer bloedvaten gevormd. Wij denken daarom dat het aantal neutrofielen dat gevonden wordt in de vloeistof die de patiënt na een aantal uur weer uit de buikholte laat lopen (effluent), een indicatie kan zijn voor de mate van schade en ontsteking in de buikholte.

In de hierboven beschreven ratten studies kan de schade aan de weefsels gemakkelijk bestudeerd worden. In patiënten is dit veel moeilijker te onderzoeken. Daarom is het van belang dat er markers gevonden worden die bepaald kunnen worden in de effluenten van de patiënten. Er zijn verschillende technieken om dit soort markers op te sporen.

In **hoofdstuk 8** hebben wij gebruik gemaakt van mRNA microarray (genen) analyse. Deze analyse hebben wij op RNA uitgevoerd afkomstig van de mesothel cellen van ratten die zijn behandeld met de standaard dialyse vloeistof met veel glucose afbraak producten, of met een verbeterde vloeistof die veel minder glucose afbraak producten bevat. Uit de microarray analyse bleek dat het immuun systeem en het afweer mechanisme van dieren behandeld met de standaard dialyse vloeistof verslechterd was ten opzichte van de dieren behandeld met de nieuwe vloeistof. Een van de genen die uit deze analyse naar voren kwam heet neutrophil-associated-gelatinase-lipocalin2 (NGAL). Na verdere bestudering van dit gen bleek dat dit een marker zou kunnen zijn voor de schade die optreedt aan de mesothel cellen in de buikholte. We hebben indicaties gevonden dat NGAL er voor kan zorgen dat mesothel cellen niet in fibroblasten veranderen. Dus hoe meer NGAL er gemaakt wordt door de mesothel cellen, hoe minder fibrose er waarschijnlijk zal optreden. Helaas bleek het moeilijk te zijn om in de effluenten te meten hoeveel NGAL de mesothel cellen produceren omdat neutrofielen deze marker ook kunnen maken. Misschien zou toediening van NGAL in de buikholte bij kunnen dragen aan de preventie van EMT en schade aan de buikwand en zijn maar hiervoor is verder onderzoek noodzakelijk.

In **hoofdstuk 9** hebben wij gekeken of we op een andere manier nieuwe markers konden identificeren. Dit hebben wij gedaan aan de hand van de proteomics techniek (eiwit analyse). We hebben effluenten opgevangen van patiënten die met de

standaard dialyse vloeistof of met de nieuwe dialysevloeistof behandeld worden. In de effluenten van beide vloeistoffen hebben we de eiwit samenstelling geanalyseerd en gekeken naar eiwitten die verschillen tussen de vloeistoffen. Het blijkt dat de standaard vloeistof veel meer eiwitten bevat die matrix kunnen vormen en dus leiden tot verdikkingen in de buikwand. In de effluenten van patiënten behandeld met de nieuwe vloeistof zaten voornamelijk eiwitten die ontstekingsremmend zijn en er voor zorgen dat er minder bloedvaten gevormd worden. Een van deze eiwitten is Tissue Factor. Tissue Factor werd wel gevonden in effluenten van patiënten behandeld met de nieuwe vloeistof maar niet in de patiënten die behandeld waren met de standaard dialyse vloeistof. Het blijkt dat Tissue Factor er voor kan zorgen dat er minder schade aan de bloedvaten optreedt en de bloedvaten minder snel gaan lekken. Het is daarom van belang om meer onderzoek te doen naar deze marker.

Samengevat (**hoofdstuk 10**) laat dit proefschrift zien dat het met bepaalde medicatie mogelijk is om schadelijke processen die optreden tijdens peritoneale dialyse te voorkomen. Het behouden van de ultrafiltratie capaciteit is lastig en waarschijnlijk alleen succesvol bij therapieën waarbij meerdere processen worden geremd. Uit de rattenstudies blijkt dat het voorkomen van ontstekingsprocessen minder belangrijk is voor het behouden van de ultrafiltratie capaciteit dan verondersteld werd. Fibrose, angiogenese en EMT daarentegen blijken een belangrijke rol te spelen in het verslechteren van de ultrafiltratie. Een van de mogelijkheden om meerdere schadelijke processen te remmen is de behandeling met het actief vitamine D/ Paricalcitol. Behandeling met Paricalcitol biedt daarom veel perspectief voor vervolgstudies in patiënten. Op basis van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is een nieuwe nierstiching subsidie toegewezen om een klinische studie op te starten en de mechanistische werking van paricalcitol te onderzoeken.

Daarnaast hebben wij laten zien dat er verschillende methoden zijn om nieuwe markers te vinden die de schade aan de buikvlies kunnen voorspellen. Meer onderzoek naar de markers die wij hebben gevonden (NGAL en Tissue Factor) is noodzakelijk om de daadwerkelijke voorspelbaarheid van deze markers te testen.

Kortom, onderzoek naar nieuwe markers die in een vroeg stadium schade in de buikholte kunnen voorspellen en het vinden van nieuwe medicatie die schade kan voorkomen zoals beschreven in dit proefschrift, is van belang om patiënten langer te kunnen behandelen met de peritoneale dialyse techniek.