

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
Abteilung für Nephrologie & Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. B. Grabensee

**Stickstoffmonoxidproduktion (NO) durch
Peritonealmakrophagen von CAPD-Patienten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Maryam Mirza Tabatabaei

2003

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab, Dekan

Referent: Prof. Dr. med. J. Plum

Korreferent Prof. Dr. med. vom Dahl

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	1
1	Einleitung	4
1.1.	Einführung und Geschichte der Peritonealdialyse.....	4
1.2.	Die CAPD-assoziierte Peritonitis.....	7
1.3.	Regulation der peritonealen Infektabwehr.....	9
1.4.	Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO).....	13
1.4.1.	Einleitung.....	13
1.4.2.	Biosynthese und Freisetzung von NO.....	14
1.4.3.	Die NO-Synthasen (NOS).....	14
1.4.4.	Wirkung von NO.....	16
1.4.5.	Aktueller Wissensstand und offene Fragen.....	20
1.5.	Untersuchungsziele.....	28
2.	Material und Methodik	30
2.1.	Patienten.....	30
2.1.1	Patientenstatistik.....	30
2.2.	Materialien.....	31
2.3.	Gewinnung von Peritonealflüssigkeit (PDF) und Plasma (P).....	31
2.4.	Zellisolierung.....	32
2.4.1.	Isolierung und Kultivierung von humanen Peritonealmakrophagen (PMØ).....	32
2.4.2	Isolierung und Kultivierung von humanen Blutmonozyten.....	33
2.5.	Identifizierung und Vitalitätsbestimmung von Peritonealmakrophagen (PMØ) und Blutmonozyten (HBM).....	33

2.5.1.	Peroxidase-Färbung.....	34
2.5.2.	Trypan-Blau-Färbung.....	35
2.6.	Stimulation von Peritonealmakrophagen bzw. Blutmonozyten ..	36
2.7.	Nitrit (NO ₂)-Bestimmung im Dialysat und Plasma.....	36
2.8.	Zellproteinbestimmung nach Bradford.....	37
2.9.	Colorimetrische Testverfahren.....	38
2.9.1	MTT-Test.....	38
2.10.	Zytokinmessung.....	38
2.10.1.	Interleukin-6 Bestimmung.....	38
2.10.2.	Interleukin-8 Bestimmung.....	39
2.11.	RT-PCR zur Bestimmung von iNOS-mRNA	39
2.12.	Statistische Auswertung.....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1.	In vitro Untersuchungen.....	42
•	Vitalitätstest von PMØ und HBM mittels des MTT-Tests.....	42
•	Einsatz von verschiedenen Zytokinen an PMØ und HBM im Hinblick auf die NO-Produktion.....	44
	a- im Peritonitis freien Intervall.....	44
	b- im Falle einer einer Peritonitis.....	44
•	Einfluss von verschiedenen Inkubationszeiten und Puffer im Hinblick auf die NO-Produktion von PMØ und HBM.....	46
•	Zytokinfreisetzung von PMØ unter Einfluss verschiedener Stimulationsbedingungen und Inkubationszeiten.....	52
	1- Interleukin-6.....	52
	2- Interleukin-8.....	54

3.2.	In vivo Untersuchungen	57
	• NO-Konzentration im Plasma und im Dialysat (Peritonitis im Vergleich zum infektfreien Intervall)	57
	• Basale und stimulierte NO-Konzentration von PMØ	58
	• Expression der iNOS m-RNA von PMØ	61
4.	Diskussion	64
4.1.	Diskussion des methodischen Vorgehens	64
4.2.	Diskussion der patientenbezogenen Daten bei Peritonitis	69
4.3.	Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Umfeld	72
4.4.	Schlussfolgerung	75
5.	Zusammenfassung	77
6.	Abkürzungsverzeichnis	79
7.	Abbildungsverzeichnis	81
8.	Literaturverzeichnis	84
9.	Danksagung	102

1. Einleitung:

1.1. Einführung in die Problematik und Geschichte der Peritonealdialyse

Zur Behandlung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stehen heutzutage 3 Alternativen zur Verfügung: die chronische Hämodialyse, die Nierentransplantation und seit mehr als zwei Jahrzehnten die chronische Peritonealdialyse.

Die Hauptfunktion des Peritoneums als Dialysemembran besteht in der Entfernung harnpflichtiger Substanzen wie Kreatinin und Harnstoff, Bilanzierung des pH-Wertes und des Elektrolythaushaltes. Das Peritoneum besitzt eine große Oberfläche (1,2-1,5 m² beim Erwachsenen), welche mikroskopisch aus Mesothelzellen, zellarmem Submesothel, Fibroblasten, vereinzelt Makrophagen, Lymphgefäßen, Kapillaren und Venolen besteht. Zum anderen besitzt es eine ausgezeichnete Durchblutung. Dadurch bedingt wirkt es als eine Dialysemembran für urämische Stoffe, wenn eine Dialyseflüssigkeit in die Peritonealhöhle instilliert wird [1,2].

Vorteile dieses Verfahrens sind die schonende Nierenersatztherapie durch die kontinuierliche Behandlungsmöglichkeit, der Verzicht auf einen Blutzugang sowie die Ermöglichung einer Heimbehandlung.

Zur Historie der Peritonealdialysenentwicklung soll folgende Tabelle einen Einblick geben:

1877	Erste Installation von Kochsalzlösung in die Peritonealhöhle von Tieren→ Veränderung des Körpergewichtes→Peritoneum als Resorptionsorgan [3]
1894	Installation unterschiedlicher hypertoner Lösungen→Nachweis von Osmose entlang des osmotischen Gradienten [4]
1895	Bestimmung von Kationen und Anionen im Blut und im Dialysat nach drei stündlicher Dialysat-Verweildauer in der Bauchhöhle→Blutgefäße des Peritoneums nehmen teil am Resorptionsvorgang [5]
1922	Harnstoff/Harnsäure-Bestimmung im Dialysat→Anstieg der Konzentrationen proportional zur Verweildauer [6]
1923	Erste Versuche am Menschen: Verlangsamung des Krankheitsprozesses bei Urämikern nach Instillation von 1,5l physiologischer Kochsalzlösung in die Peritonealhöhle [7]
1930	Plazierung von Kanülen mittels Knopflochlaparotomie in die Peritonealhöhle, Instillation verschiedener Dialysatlösungen (Dextrose, NaCl)→Senkung von Rest-N-Konzentrationen bei sublimatvergifteten Patienten [8]
1931	Plazierung eines Katheters als Einwegverfahren→Abfluß und Zufluß über denselben Katheter [9]
1965	Stilettkatheter→Durchführung der chronischen Peritonealdialyse wird möglich [10]
1977	Silastik-Verweilkatheter ermöglicht die Heimperitonealdialyse [11]
1978	Durchbruch der CAPD (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) als erstes in Kanada, da hier die Produktion von faltbaren Beuteln mit Dialysaten früher als in den USA möglich war [12]
1981	Erster Einsatz der CAPD [13]

Die Peritonealdialyse kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden. Vor Anwendung wird zunächst ein periumbilical perkutan verlaufender Verweilkatheter (meist Tenckhoffkatheter) in den Douglasraum platziert .

In der ersten postoperativen Woche werden zunächst kleinere Dialysatmengen verwendet (200–500 ml), die dann in der darauffolgenden Zeit auf die gebräuchliche Menge von 1,5 – 2 l erhöht werden.

Bei der kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse (CAPD), heutzutage die meist verwendete Form, werden am Tag 4 Wechsel des Dialysats vorgenommen. Das "frische" Dialysat wird 4 Stunden intraabdominell belassen. Hierbei kommt es meist zu einem vollständigen Ausgleich der Plasma- und Dialysatkonzentrationen an harnpflichtigen Substanzen. Es entsteht das so "verbrauchte" Dialysat. Bei jedem Wechsel wird ein Volumen von 1,5 – 3 Liter ausgetauscht. Dies geschieht über die Schwerkraft und dauert 15 – 30 min.

Eine Variante der CAPD ist die kontinuierliche zyklische Peritonealdialyse (CCPD), z.B. für berufstätige Patienten. Hierbei finden die Wechsel über Nacht mittels eines halbautomatischen Peritonealdialysegerätes (sogenannte Cycler) statt, meist drei Wechsel à 2 l Dialysat bei einer jeweiligen Verweilzeit von 3 Stunden. Tagsüber werden weitere 2 Liter Dialysatflüssigkeit intraperitoneal belassen. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, bedingt durch die geringere Anzahl von Konnektionen und Diskonnektionen, die Senkung der Peritonitisfrequenz [14]. Bei Patienten mit arterieller Hypotonie sowie aus ästhetischen Gründen kann auf die Instillation von Dialysat während des Tages verzichtet werden. Man spricht dann von der nächtlichen intermittierenden Peritonealdialyse (NIPD). Der Nachteil ist eine entsprechend geringere Clearance urämischer Stoffwechselprodukte aufgrund der verkürzten Dialysezeit.

Die gebräuchlichsten Dialysatlösungen bestehen aus gepufferten (z.B. Laktat, Bikarbonat oder Pyruvat) Elektrolytlösungen (Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} und häufig Ca^{2+}); zur Erzeugung eines osmotischen Gradienten wird ein hoher Glukose- (1,5-4,25 %) bzw. Aminosäurenanteil hinzugefügt [14].

Die Anforderungen, die an eine Dialysatflüssigkeit gestellt werden, sind die Pyrogen- und Keimfreiheit, eine möglichst geringe toxische Wirkung und eine kostengünstige Herstellung, um die langfristige klinische Anwendung zu ermöglichen.

1.2. Die CAPD assoziierte Peritonitis

Die häufigste Komplikation und damit ein Versagen dieser Therapieform mit Umstellung auf eine Hämodialyse ist die infektiöse PD-assoziierte Peritonitis. Dabei stellt die mehrmals tägliche Konnektion der Dialysatbeutel mit dem PD-Katheter trotz Schulung (Händedesinfektion, Mundschutz etc.) und Einwegmaterialien beim Dialysatwechsel (Beutel, Schlauchsysteme, Konnektoren etc.) ein Risiko für die Kontamination der Bauchhöhle mit pathogenen Erregern dar.

Folgende Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung der häufig vorkommenden Keime [15]:

<u>Pathogene Erreger</u>	<u>% Anteil an Gesamtperitonitis</u>
1. Grampositive Bakterien	70 %
Koagulasenegative Staphylokokken	30-40 %
Staphylococcus aureus	20 %
Streptococcus viridans	10-15 %
Enterokokken	5 %
2. Gramnegative Bakterien	25 %
Escherichia coli	5-10 %
Pseudomonas species	5-10 %
Klebsiella species	1-3 %
Anaerobe Bakterien	< 5 %
3. Pilze (meist Candida albicans)	< 5 %
4. Mykobakterien (meist M.tuberculosis)	< 2 %
5. Kultur negativ	10-20 %

Koagulase-negative Staphylokokken sind mit fast 40% die häufigste Ursache einer bakteriellen Peritonitis. Die Therapie der Peritonitis erfolgt je nach Erregerspektrum mittels Antibiotika bzw. Fungizide intraperitoneal [16].

Ein weiterer Grund für den Abbruch der Peritonealdialysebehandlung nach einigen Jahren (meist nach 5 Jahren) ist der Verlust des Peritoneums als Dialysemembran zu fungieren, bedingt durch eine Fibrosierung der Peritonealmembran. Es folgen die Einschränkung der Ultrafiltration für freies Wasser sowie die Minderung der Clearance für harnpflichtige Substanzen [17]

Klinische Leitsymptome einer PD-assoziierten Peritonitis sind in 80% diffuse abdominelle Schmerzen, in 70% eine Abwehrspannung und in 50% eine Temperaturerhöhung [18]. Die Trübung des Dialysates, welche durch eine Erhöhung der peritonealen Leukozyten (>90% polymorphkernige Granulozyten PMN) hervorgerufen wird, ist der ausschlaggebende Hinweis. Eine Peritonitis ist ab einer Leukozytenzahl von 100 / μl Effluat definiert.

Nicht jede Kontamination der Peritonealhöhle führt notwendigerweise zu einer Peritonitis [19]. Entscheidend ist vielmehr die Balance zwischen der Resistenz der peritonealen host defense und der Virulenz der Erreger. Die Resistenz der Peritonealhöhle wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen und Mediatoren bestimmt, die ein komplexes Netzwerk bilden, welches noch nicht vollständig verstanden ist [20,21].

1.3. Regulation der peritonealen Infektabwehr: Interaktionen von Leukozyten und peritonealem Mesothelzellen im Zytokin Netzwerk

In der frühen Phase einer Peritonitis hat die zelluläre Immunantwort zunächst den Vorrang, um dann mit der humoralen Immunantwort ein komplexes Netzwerk zu bilden. Die Peritonealmakrophagen bilden die „first line“ der host defense [22]. Zuvor entwickelt sich nach Stimulation mit 'Colony-stimulating factors' (CSF) eine gemeinsame Vorläuferzelle von Granulozyten und Makrophagen, die sogenannte 'Colony forming unit' (CFU). Über die Zwischenstufen Promonozyt und Monoblast bildet sich der Monozyt, der das Knochenmark verläßt und im Blutstrom zirkuliert. Auf bestimmte Signale (CSF, IL-3 etc.) heftet er sich an das Gefäßendothel und wandert in verschiedene Gewebe und Körperhöhlen. Dort differenziert er unter dem Einfluß gewebespezifischer Signale (TNF- α , IL-4, IL-13, CSF, 1,25-Vitamine D3 etc.) zu dem jeweiligen Makrophagentyp aus. Die Peritonealmakrophage ist somit entstanden [23].

Nach Kontakt mit dem Mikroorganismus, meist durch die Lipopolysaccharide der Zellwand gram-negativer Bakterien stimuliert, sezernieren sie neben der Funktion der zellulären Abwehr auch humorale Signale in Form von Zytokinen und Arachidonsäuremetaboliten. Es folgt eine Kaskade entzündlicher Prozesse. Von besonderem Interesse sind die proinflammatorischen Interleukine (IL) IL-1 α , IL-1 β , Tumornekrosefaktor (TNF) sowie IL-6, welches sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Die Produktion chemotaktischer Mediatoren wie das IL-8 oder das Lipooxygenase-Produkt Leukotrien B₄ (LTB₄) durch die Peritonealmakrophagen locken neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen zum Ort der Entzündung an [24].

Zytokine wie IL-6 und IL-8 stellen potentielle Mediatoren in der inflammatorischen Antwort von Infektionen dar und sind aktive

Bestandteile in der Zytokinkaskade. IL-6 agiert als ein endogenes Pyrogen, stimuliert Hepatozyten, um Akutphasenproteine zu sezernieren und wirkt stimulierend auf mukosale B-Lymphozyten [25]. Es stimuliert aber auch die Produktion von IL-1 verschiedener Zellreihen.

IL-8 hingegen hat eine chemotaktische Eigenschaft. Es wird von Monozyten, Makrophagen und endothelialen Zellen synthetisiert und ist entscheidend für die Anlockung von Granulozyten an den Ort der Entzündung [26].

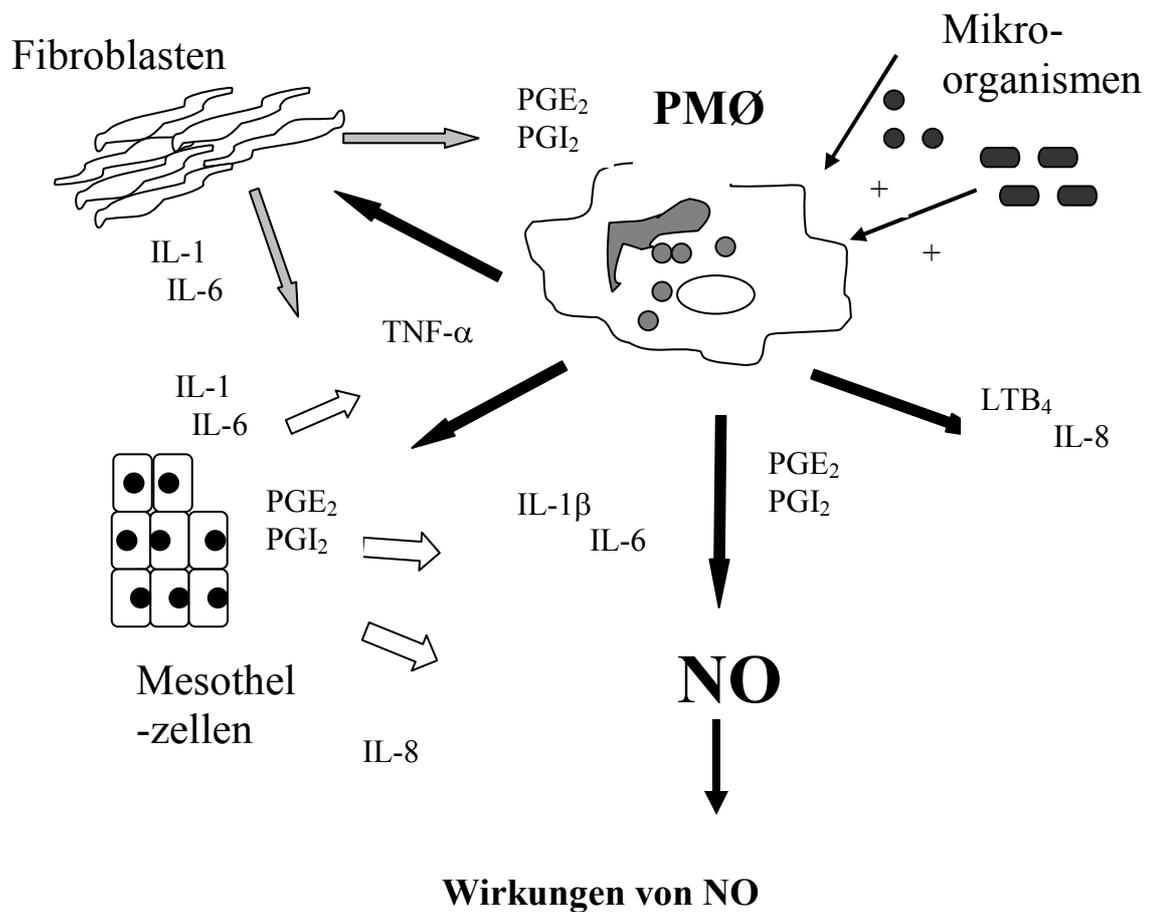
IL-6 und IL-8 werden von verschiedenen Zellen, hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen, produziert und werden nach Stimulation mit bakteriellen Produkten wie LPS, Interleukin -1 und Tumornekrosefaktor- α freigesetzt. Erhöhte IL-6 Konzentrationen konnten im Plasma von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, bei Patienten mit Hämodialyse, akuter Pyelonephritis und Sepsis gefunden werden. Hohe Konzentrationen konnten aber auch bei Patienten mit CAPD während einer Peritonitis im Vergleich zu infektfreiem Intervall entdeckt werden. Hohe IL-8 Konzentrationen konnten während einer Sepsis nachgewiesen werden.

Neben den Peritonealmakrophagen spielen Mesothelzellen bei der Immunantwort eine große Rolle [27]. Sie reagieren zum einen auf zellulärer Ebene auf bakterielle Exoprodukte [28]. Außerdem sind sie an der humoralen Immunantwort nach Stimulation von Mediatoren oder bakteriellen Antigenen durch die Sekretion von einer Vielzahl von Zytokinen, Prostaglandinen, Wachstumsfaktoren und Komponenten der Fibrinolyse beteiligt [29]. Stimuliert durch IL-1 β und/oder TNF α produzieren sie Mediatoren wie IL-1, IL-6, IL-8, PGI₂, PGE₂ und LTB₄ [30]. Die Mediatoren IL-8 und LTB₄ sind starke chemotaktische Substanzen, die weitere Makrophagen und neutrophile Granulozyten zum Ort der Entzündung anlocken sollen [31]. Ferner bilden sie Prostaglandine

wie das 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, PGF_{2α} und TXB₂. Diese bewirken eine gesteigerte Vasodilatation, wodurch eine hohe Anzahl weiterer immunkompetenter Zellen an den Ort der Entzündung gelockt werden kann [32].

Daneben scheinen auch Fibroblasten als Bestandteil des Peritoneums durch Produktion bestimmter Mediatoren wie z.B. das IL-8 an der host defense beteiligt zu sein. Ihre Funktion ist jedoch noch nicht ganz verstanden [22]. Zusammenfassend entsteht so das Modell des intraperitonealen Zytokin-Netzwerkes aus Mikroorganismen, Peritonealmakrophagen, Mesothelzellen und Fibroblasten [22].

Folgende Abbildung soll die geschilderten Vorgänge verdeutlichen:



- **Zytotoxizität gegenüber Mikroorganismen**
- **Triggerung des Zelltodes mittels Apoptose oder Nekrose**
- **Ultrafiltrationsverlust bei Peritonitis sowie Langzeitperitonealdialyse**
- **Steigerung der Vasodilatation/Permeabilität**
- **Förderung der Angiogenese**
- **Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität**
- **Gewebsschädigung durch Bildung hochreaktiver Radikale (Peroxynitrit)**

Abbildung 1: Schematische Darstellung des intraperitonealen Zytokin-Netzwerkes aus Mikroorganismen, Peritonealmakrophagen, Mesothelzellen und Fibroblasten. Erläuterung zu den Abkürzungen siehe Akürzungsverzeichnis.

1.4. Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO):

1.4.1. Einleitung

Neben den oben geschilderten Mediatoren scheint Stickstoffmonoxid (NO) eine wesentliche Rolle sowohl als ein zellulärer Mediator als auch ein zytotoxisches Radikal in der 'peritoneal host defense' einzunehmen.

NO fungiert als ein Signalmolekül z.B. in Blutgefäßen, in denen eine kontinuierliche Ausschüttung durch Endothelzellen zu einer Vasodilatation, bedingt durch die Interaktion mit der darunterliegenden glatten Muskelzellschicht, und damit verbunden zu einer Aufrechterhaltung des nutritiven Blutzuflusses führt. Andererseits nimmt NO eine wichtige Rolle innerhalb der Immunabwehr ein: Makrophagen können, wenn sie aktiviert werden, hohe Mengen an NO produzieren, welches als Killermolekül Mikroorganismen und maligne Tumorzellen zerstören kann. Seit 1980 gibt es sichere Nachweise dafür, daß NO endogen im menschlichen Körper produziert wird. Damals konnte gezeigt werden, dass meßbar höhere Nitrat-Mengen trotz Diät im Urin ausgeschieden wurden. Daneben zeigte sich im Fall von Fieber oder Diarrhoe eine neunfach höhere Nitratausscheidungssteigerung. Die Nitratmenge im Urin von Ratten konnte zehnfach erhöht werden, wenn Fieber mittels einer Injektion von Bakterienbestandteilen induziert wurde.

Bis 1987 sprach man vom sogenannten EDRF (Endothelium-Derived-Relaxing-Factor), welches zwar vasodilatativ wirkte, aber über dessen chemische Struktur nicht viel bekannt war. Erst Furchgott und Ignarro und später auch Moncada bewiesen, dass EDRF und NO sehr ähnliche biologische Eigenschaften besaßen und dass L-Arginin der Precursor beider Substanzen war [33, 34]. Darüberhinaus wirken beide Substanzen stimulierend auf die Umsetzung von Guanylatzyklase in zyklisches GMP in

Zielzellen, welches wiederum Proteinkinasen aktiviert und durch Dephosphorylierung von Myosin somit zur Muskelrelaxation führt. Nach diesem Wirkungsprinzip fungiert NO in glatten Muskelzellen, nachdem es von Endothelzellen ausgeschüttet wurde.

1.4.2. Biosynthese und Freisetzung von NO

NO entsteht durch die Oxidation von einem der beiden chemisch äquivalenten Guanidino-Gruppen des L-Arginins zu äquimolaren Mengen von L-Citrullin mittels einer Enzymgruppe, den NO-Synthetasen (NOS) [35]. Der erste Schritt dabei ist die Hydroxilierung von NH_2 innerhalb der Guanidinogruppe von L-Arginin. Normalerweise reichen die L-Arginin Ressourcen aus, um kontinuierlich NO Mengen zu sezernieren. Dabei wird L-Citrullin zu L-Arginin unter Bindung eines NH_2 Moleküls zurückverwandelt. Dieser modifizierte Harnstoffzyklus hat somit zwei Funktionen: eine sekretorische, um L-Arginin für die NO-Synthese bereitzustellen und eine exkretorische, um Harnstoff, welches durch den Zellmetabolismus anfällt, zu eliminieren.

1.4.3. Die NO-Synthasen (NOS)

Die NO-Synthasen werden in drei Isotypen unterteilt. Sie sind Produkte verschiedener Gene. Für eine Aktivierung werden unterschiedliche Kofaktoren benötigt. Alle NOS sind Dimere und besitzen Bindungsstellen für die Kofaktoren NADPH, FAD und FMN. Ihr Molekulargewicht liegt je nach Isotyp zwischen 130-160 kDa. Voraussetzung für den L-Arginin-Umsatz und somit für die NO-Produktion ist die Dimerisierung der NOS,

welche H₄-Biotpterin abhängig ist, und die Bindung des Kalmodulins, die je nach Isotyp Kalzium abhängig oder unabhängig verläuft [36].

Zu den 3 Isotypen der NO-Synthasen zählt man die endotheliale (ecNOS), die neuronale (nNOS), beide werden zu den konstitutiven NO-Synthasen (cNOS) zusammengefaßt, und schließlich die induzierbare (iNOS) Form.

Die cNOS konnte in Endothelzellen, Neuronen, in Zellen des Verdauungstraktes und in der Niere [37-39] gefunden werden. Sie werden konstitutiv exprimiert und produzieren nur kleine Mengen an NO, dessen Synthese und Freisetzung schnell reguliert wird. Neben NADPH, FAD und FMN benötigen konstitutive Isotypen für ihre Aktivität den sogenannten Kalzium-Kalmodulin-Komplex. Sie kann abhängig vom Zelltyp entweder membrangebunden (ecNOS) oder freilöslich im Zytosol (nNOS) vorkommen. Weitere Unterschiede beider NOS Isotypen sind ihr Molekulargewicht und der Genort ihrer Produktion. Damit Kalmodulin an das Enzym Kalzium-abhängig bindet, gibt es sogenannte Kalzium-mobilisierende Agonisten. Im Bereich des Endothels ist bekannt, dass dies z.B. durch Bradykinin und Acetylcholin gewährleistet wird. Sie veranlassen dabei, dass Kalzium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. In Neuronen dagegen bewirkt Glutamat die Öffnung von Kalziumkanälen und den Einstrom von Kalziumionen. Werden Kalzium-Konzentrationen von 500nM erreicht, liegt die maximale Aktivität der Enzyme vor.

Die iNOS dagegen ist zytosolisch vorhanden und wird nach Stimulation mit Zytokinen und bakteriellen Endotoxinen gebildet [40, 41]. Sie findet man nach Aktivierung in Makrophagen, in neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen [42, 43]. Für ihre Aktivität wird kein Kalzium benötigt, jedoch Kalmodulin und die Kofaktoren NADPH, FAD, FMN und Tetrahydrobiopterin. Die iNOS-Kalmodulin-Komplex Bildung ist irreversibel. Die iNOS-Aktivität ist abhängig von einer de-novo-RNA- und

Proteinsynthese. Kortikosteroide und Zytokine (IL-4, IL-10) können die iNOS Expression blockieren.

Die Biosynthese von NO aus L-Arginin kann von L-Arginin-Analoga verhindert werden. Beispiele hierfür sind L-NAME und N^G-nitro-L-Arginin Methylester. Die meisten NO-Synthase Inhibitoren sind Analoga von L-Arginin oder beinhalten eine Guanidinogruppe. Von Methylenblau weiß man z. B., dass sie die Wirkung von NO auf die Guanylatzyklase aufheben kann. Endogen werden methyliertes L-Arginin wie L-NAME und N^G-Dimethylarginin produziert und akkumulieren im Nierenversagen.

1.4.4. Wirkung von NO

NO ist ein pleiotrop wirkendes Mediator- und Regulator-Molekül mit sehr wichtigen Aufgaben in der intra- und interzellulären Kommunikation. Es hat große Bedeutung in der Kreislaufphysiologie, der Neurowissenschaft aber auch in der Immunologie [33, 44-46] gewonnen. NO ist außerdem ein relativ stabiles Nitrogen-Radikal und wird von verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems, Hepatozyten, Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten, Tumorzellen, Thrombozyten, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, aber auch von Makrophagen [47-56] produziert.

NO ist im Gegensatz zu herkömmlichen Signalmolekülen ein Radikal, gasförmig, wird nicht gespeichert und diffundiert vom Ort seiner Formation. NO ist sowohl wasser- (bis zu 2 mmol/L bei 20°C und 1 atm) als auch fettlöslich. NO ist aufgrund seiner Lipophilie leicht membrangängig. Es besitzt eine Halbwertszeit von 3-50 Sekunden [58, 59]. Aufgrund der Halbwertszeit von wenigen Sekunden wird NO in wässriger Lösung durch Sauerstoff zu stabileren Produkten wie Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) oxidiert [60, 61]. Andererseits kann NO aber auch Nitrit mit

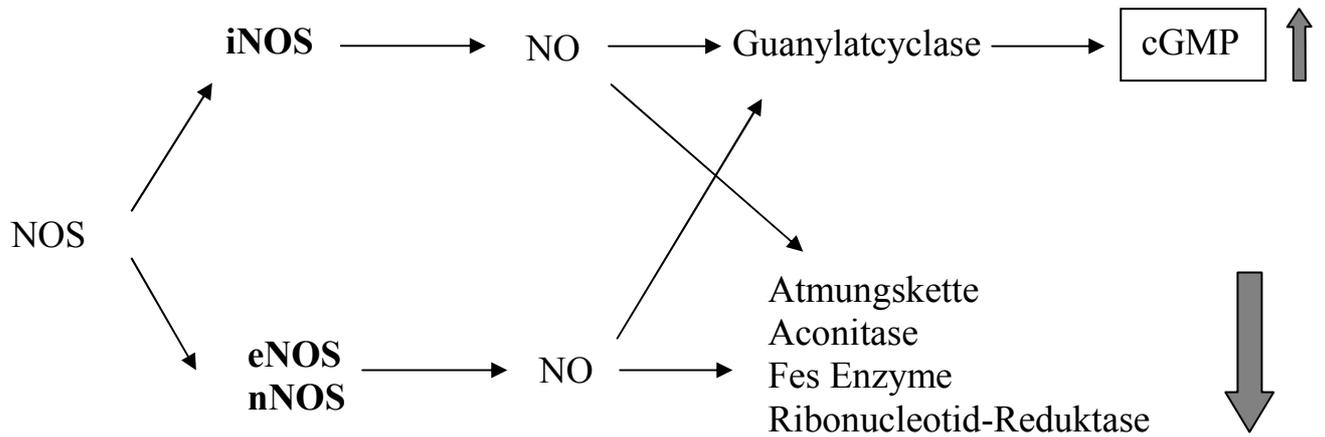
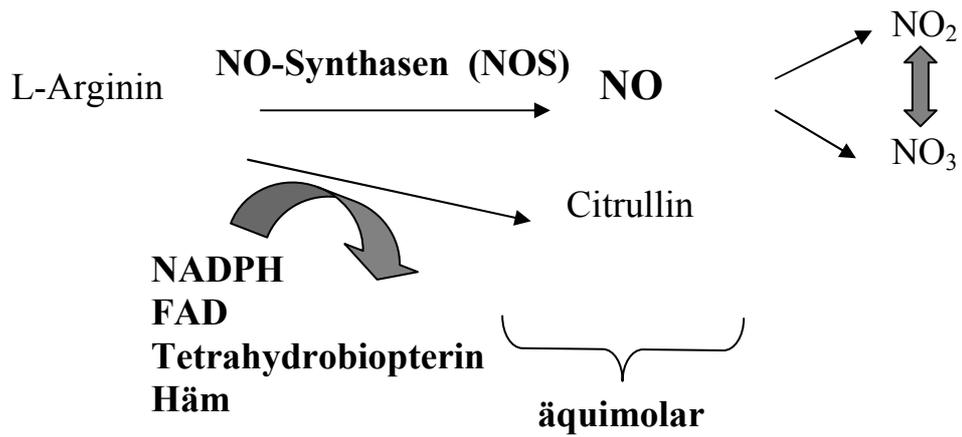
Sauerstoff-Anion-Radikal zum Peroxynitrit-Anion, Wasserstoff-Peroxid reagieren oder zum Hydroxyl-Radikal und Nitrit-Radikal zerfallen [62, 63]. Endothelzellen können mittels der eNOS kleine NO Mengen produzieren, nachdem sie durch Agonisten wie Acetylcholin, Histamin, Bradykinin, ATP oder physiologische Reize wie Pulsfluß, Flußwiderstand, Hypoxie und Scherkräfte stimuliert wurden. Dabei wird nach Bindung des NO an der Guanylatzyklase sowohl in Endothelzellen als auch benachbarten Muskelzellen zyklisches GMP synthetisiert, welches zu einer Relaxation der Muskelzellen und somit zu einer Blutdrucksenkung führt. Weiterhin kann endothelial gebildetes NO die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten beeinflussen. Das dabei gebildete zyklische GMP in den Thrombozyten kann eine Aggregation von Blutplättchen an das Endothel im Sinne einer Antithrombose verhindern. Gleichzeitig kann eine Adhäsion von Leukozyten an das Endothel im Falle von Entzündungsprozessen mittels der Bildung der eNOS verhindert werden. Bei Inhibition der NOS kommt es folglich zur Entstehung von entzündlichen Prozessen.

Im zentralen und peripheren Nervensystem übernimmt NO die Rolle eines Neurotransmitters. Hohe Konzentrationen der cnNOS liegen im Cerebellum, Hypothalamus, Hippokampus und autonomen Nervensystem vor. NO kann hier sowohl aktivierend als auch inhibitorisch fungieren. Im Konkreten kann NO z.B. relaxierend im Gastrointestinaltrakt, aktivierend auf die Nerven des Corpus cavernosum des Penis und verstärkend bei der Konditionierung des Lernens wirken.

Als endogener Immunmodulator kann NO von Makrophagen gebildet, welche eine Schlüsselrolle im Immunsystem einnehmen, inhibitorisch bei Infektionen und Tumorwachstum wirken. NO kann zytotoxisch in der unspezifischen Abwehr gegen Mikroorganismen und Tumorzellen wirken, wenn es von Makrophagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen sezerniert wird. NO kann aber nach Aktivierung der iNOS in hohen

Mengen pathologisch sein. Viele Erkrankungen (z.B. Graft-versus-Host-Reaktionen, Glomerulonephritis) können von hohen NO-Mengen begleitet oder auch direkt verursacht sein.

Folgende Zeichnung veranschaulicht die Bildung von NO:



1.4.4. Aktueller Wissensstand und offene Fragen

Die Peritonealdialyse gilt heute als eine mögliche Standardtherapie bei chronischer Niereninsuffizienz. Einerseits stellt die Peritonitis jedoch eine häufige und zugleich ernsthafte Komplikation dar. Andererseits ist die Langzeittherapie durch progressive Veränderungen bezüglich der Transportfähigkeit der Peritonealmembran beeinträchtigt. Dabei scheint das Stickstoffradikal NO in beiden Fällen eine entscheidende Rolle zu spielen. NO reguliert diverse physiologische Prozesse wie die Relaxation glatter Muskulatur, die Neurotransmission und als Effektor-Molekül die Makrophagen-vermittelte Zytotoxizität gegenüber Mikroorganismen und Tumorzellen. Zumindest im Rattenmodell können diese Prozesse nachgewiesen werden [35, 64-65]. Eine mittels E.coli induzierte Peritonitis wechselte bei Verabreichung des NO-Synthase-Inhibitors NMA von einer nicht letalen in eine schwere letale Verlaufsform.

Bezüglich der Zytotoxizität scheint NO, von Makropagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen sezerniert, ein Agens der unspezifischen Abwehr [66, 67] zu sein, zum Beispiel von Pilzen, Helminthen, Toxoplasmosen, Leishmanien, Schistosomen und Viren [68-72]. Andererseits ist NO direkt an der Gewebszerstörung wie im Falle der Glomerulonephritis und der rheumatoiden Arthritis beteiligt [73-75].

Erklärt wird die Zytotoxizität des NO durch die Reaktion mit Eisen-Schwefel-Gruppen von Häm- sowie Nicht-Häm-Proteinen, was zu einer Degradation und Inaktivierung führt [76], mit dem Enzym cis-Acotinase, was zu einer Blockierung des Zitratzyklus führt [77], aber auch mit der DNA, was wiederum eine Denaturierung, Mutationen oder DNA-Strangabbrüche verursachen kann [78].

Bislang konnte gezeigt werden, dass Maus-Makrophagen, einschließlich Peritonealmakrophagen, eine hohe Menge an induzierbarer NOS (iNOS)

mRNA, iNOS-Synthase und NO nach Stimulation mit Agenzien wie Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon- γ (IFN- γ) produzieren [79]. In der Tat konnte eine intraperitoneale IFN- γ Konzentrationserhöhung bei Patienten mit einer Peritonitis beobachtet werden. Dies stimmt mit einer Zellzahlerhöhung polymorphkerniger Zellen im Effluat überein [80].

Obwohl gesunde menschliche Chondrozyten, Hepatozyten und Zellen der Kolon-Tumor-Reihe DLD-1 hohe Mengen an NO nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen und / oder LPS [81-83] produzieren können, ist dennoch die Bedeutung und die Menge der intraperitonealen NO-Produktion bei Peritonealdialyse-Patienten während einer Peritonitis noch nicht vollständig geklärt. Weinberg *et al.* [84] konnten eine signifikante, jedoch niedrige NO-Freisetzung von Peritonealmakrophagen (PM \emptyset) in einer laparoskopischen Untersuchungsreihe bei gesunden Frauen nachweisen, nachdem jene Zellen zuvor mit LPS und IFN- γ in vitro behandelt wurden. Darüber hinaus berichten Yang *et al.* [85] und Douma *et al.* [86] bei PD-Patienten über eine signifikante intraperitoneale NO₂ / NO₃ Akkumulation im Effluat bei einer bakteriellen Peritonitis. Diese Akkumulation stimmte mit der Akuität einer Peritonitis überein. Erhöhte NO-Mengen hielten sogar länger als die Leukozytenzahl im Peritonealeffluat. Plum *et al.* bewiesen, dass das NO Verhältnis von Dialysat zum Serum im Falle einer Peritonitis zugunsten des Dialysats verschoben ist, während im Peritonitis-freien Intervall NO vermehrt im Serum nachzuweisen ist. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass der Entstehungsort von NO tatsächlich in der Peritonealhöhle selbst gelegen ist und dass dort vorkommende Zellen für diese Produktion verantwortlich sind [88]. Weiterhin wiesen Yang *et al.* [85] nach, dass Nitritmengen erhöht blieben, obwohl bereits die Leukozytenzahl im Dialysat im Normbereich lag und Symptome und Zeichen der Peritonitis nach effektiver Therapie verschwanden. Erst normalwertige Nitrit-

Konzentrationen im Effluat, erreicht durch adäquate antimikrobielle Therapie, waren ein Hinweis dafür, dass eine peritoneale Inflammation ausgeheilt war. Rezidivierende Peritonitiden (Relapse) traten nach 30-60 Tagen nicht ein. Somit schließen sie, dass NO daher als ein Marker einer beginnenden Peritonitis aber auch als Verlaufsparemeter bis zum Abklingen einer Peritonitis angesehen werden kann. Als nächstes wiesen sie nach, dass NO im Falle einer Peritonitis intraperitoneal produziert wird. Douma et al. bewiesen, dass Nitratmengen von PD-Patienten ohne Infekt entlang Diffusion aus der Blutzirkulation ins Dialysat gelangen. Während einer Peritonitis zeigt eine erhöhte Nitratkonzentrationsverhältnis im Dialysat zum Plasma an, dass das Nitrat vielmehr am Ort des Geschehens, dem Peritoneum, produziert wird. Zudem sinkt dieses Verhältnis nach erfolgreicher Therapie. Polymorphkernige Zellen, v.a. Peritonealmakrophagen, scheinen NO während einer Peritonitis zu produzieren. Obwohl die NO Produktion sowohl durch konstitutive als auch induzierbare NO-Synthasen katalysiert wird, scheint aus immunpathologischer Sicht der Schwerpunkt auf der iNOS, welche in Makrophagen exprimiert wird, zu liegen und das bereits in dieser Studie beschriebene Phänomen zu erklären. Zusammenfassend ist die Nitritmessung eine einfache und zugleich schnelle Methode, um eine peritoneale Inflammation zu entdecken, aber auch die Therapiedauer festzusetzen. Sie empfehlen die Nitritmessung bei CAPD-Patienten mit Peritonitis trotz Verschwindens der anfänglichen Symptome und vor Unterbrechung der Gabe von Antibiotika, um mögliche Residuen einer peritonealen Inflammation frühzeitig zu entdecken. Bei persistierenden erhöhten Nitritmengen ohne klinische Symptome ist sogar eine längere Gabe von Antibiotika indiziert.

Bezüglich der iNOS-Expression konnten Weinberg *et al.* [84] nachweisen, dass menschliche Monozyten und Peritonealmakrophagen unter

bestimmten Voraussetzungen iNOS mRNA und Protein in vitro synthetisieren, jedoch produzieren sie nur eine geringe Menge an NO. Die basale iNOS-Aktivität und NO-Produktion der Blutmonozyten konnten nach Stimulation mit LPS und/oder IFN- γ nicht wesentlich beeinflusst werden, Peritonealmakrophagen hingegen wiesen eine Produktionssteigerung unter denselben Bedingungen auf. Die Ursache für die geringere NO Produktion durch Peritonealmakrophagen trotz Stimulation (LPS, IFN- γ , IL-1 und TNF) im Gegensatz zu Mausmakrophagen, welche unter den gleichen Stimuli hohe Mengen an iNOS mRNA und Protein exprimieren, können folgende sein:

- 1- Peritonealmakrophagen haben die Fähigkeit, Nitrit und Nitrat zu anderen Produkten zu metabolisieren, die mit ihrem Assay nicht zu entdecken ist,
- 2- die Promoter Region der iNOS von humanen mononuklearen Zellen unterscheidet sich von dem in Mausgenen, und humane Phagozyten benötigen andere Stimuli für die Aktivierung hoher NOS Exprimierung und folglich hoher NO-Konzentrationen,
- 3- humane mononukleare Phagozyten produzieren entwicklungsgeschichtlich keine hohen NO-Konzentrationen. Eventuell existieren in diesen Zellen andere antimikrobielle bzw. antitumoröse Mechanismen.

Reiling *et al.* [1] können klar belegen, dass sowohl iNOS als auch cNOS mRNA in Monozyten und Makrophagen exprimiert werden, insbesondere nach externen Stimulationen (LPS/ IFN- γ). Dabei beeinflussen sich iNOS und cNOS gegenseitig. Wird iNOS mRNA durch Stimulation exprimiert, scheint cNOS mRNA vermindert induziert zu werden. Andererseits waren sie nicht in der Lage, signifikante Nitritmengen zu finden. Die Gründe

dafür können folgende sein:

- 1- NO wird in zu geringer Menge produziert, als dass es entdeckt werden kann,
- 2- NO unterliegt als ein reaktionsfreudiges Radikal sofort anderen chemischen Reaktionen,
- 3- NO-Synthasen werden durch endogene Inhibitoren beeinträchtigt,
- 4- NOS werden posttranskriptionell reguliert,
- 5- Zytokine oder andere Faktoren, welche von Makrophagen ebenfalls produziert werden, unterdrücken die NO-Formation.

Andere Arbeitsgruppen wie Brauner *et al.*, Lin *et al.* [89], Nakanishi *et al.* [90], Zemel *et al.* [91] können nachweisen, dass zu Beginn einer Peritonitis sowohl die mRNA als auch die Proteine der IL-6, IL-8 im Dialysat von CAPD-Patienten erhöht sind. Dabei stimmten die erhöhten Werte mit der steigenden Anzahl von polymorphkernigen Zellen, welche die akute Phase einer Peritonitis widerspiegeln, überein.

Neuere Arbeiten sehen NO von einer anderen Perspektive. Der Verlust der Ultrafiltration ist eine häufige Komplikation der Peritonealdialyse. 3 Mechanismen sind heute funktionell dafür verantwortlich:

- 1- eine Vergrößerung der effektiven peritonealen Oberfläche mit einer nachfolgenden Erhöhung der Glukoseabsorption und Abnahme des osmotischen Gradienten,
- 2- eine Abnahme von ultrakleinen Poren innerhalb des kapillären Endothels mit Abnahme der Permeabilität für freies Wasser,
- 3- eine Kombination aus beiden.

Aus molekularer Sicht gibt es hierfür 2 Moleküle, die dies begünstigen können:

- A) Aquaporin-1 (AQP-1), ein Wasser-Kanal, welcher im Endothel von Kapillaren, Venolen und kleinen Venen des Peritoneums vorliegt,
- B) NO, das systemisch die Vasodilatation und die mikrovaskuläre Permeabilität beeinflusst.

Die Gabe von Nitroprussid, einem NO-Donator, ins Dialysat erhöht die effektive peritoneale Oberfläche [87]. Die Gabe von NOS-Inhibitoren wie L-NAME erhöhen die Ultrafiltration, wie Breborowicz *et al.*[92] zeigen. Coumbet *et al.* fassen mittels eines Rattenmodells mit Peritonitis zusammen, dass erhöhte NO-Konzentrationen die Ultrafiltration während der Peritonealdialyse regulieren [93-95]. Kone *et al* weisen nach, daß NO die Vasodilatation vermittelt, die Angiogenese mittels Interaktion mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) fördert und mit Zytokine interagiert, um die mikrovaskuläre Permeabilität zu erhöhen [96]. All das fördert die Vergrößerung der effektiven peritonealen Oberfläche, was wiederum die Glukoseabsorbtion und einen Abfall des osmotischen Gradienten zur Folge hat. Es resultiert der Verlust der Ultrafiltration. Combet stellt dar, dass die NOS-Aktivität sowohl in humanem als auch Ratten-Peritoneum erhöht ist. Sie ist vor allem im Falle einer Peritonitis als auch bei chronischer Peritonealdialyse (länger als 18 Monate) erhöht. Im Gegensatz dazu bleibt die Exprimierung von AQP-1-Kanälen in beiden Situationen konstant. Verantwortlich für die erhöhte NOS-Aktivität im Falle einer Peritonitis ist dabei sowohl die Kalzium-abhängige, konstitutive endotheliale cNOS als auch die Kalzium-unabhängige, induzierbare makrophageale iNOS Isoform. Die eNOS beeinflusst die vaskuläre Proliferation, die iNOS ist durch die akute

Infektion bedingt. Dagegen ist in infektfreien Intervallen die eNOS Aktivität erhöht. Eine andere Feststellung ist, ob die Höhe der NOS-Aktivität mit der Langzeit-Peritonealdialyse korreliert. Es wird davon ausgegangen, dass eine lokale NO-Produktion, die durch spezifische NOS-Isoformen induziert wird, eine Schlüsselrolle in der Regulation der peritonealen Permeabilität einnimmt. Andererseits können andere Wirkungen des NO die Struktur des Peritoneums negativ verändern. NO als Radikal kann in hohen Konzentrationen mit Sauerstoff und Superoxidanionen reagieren und zu einer S-Nitrosierung von Cystin oder Tyrosin führen, welche eine interstitielle Fibrose oder Nitrosierung von Endothelproteinen bei Langzeit-Peritonealdialyse nach sich zieht.

Arbeitsgruppen wie Arese *et al.* untersuchen die Wirkung von urämischem Plasma von Patienten mit Hämodialyse (HD) auf 3 verschiedene Zellarten mit verschiedenen NOS-Aktivitäten: tEnd.1 Endothelzellen exprimieren sowohl eNOS als auch iNOS, humane Endothelialzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC) exprimieren nur eNOS, schließlich produzieren J774-Makrophagen iNOS nach adäquater Stimulation mit Zytokinen (TNF und IFN- γ) [97]. Fast 80 % der verwendeten urämischen Plasmen beeinträchtigen die NOS-Aktivität in tEnd.1- und in J774-Zellen nach Stimulation mit Zytokinen. In HUVEC haben sie dagegen keinen Einfluß.

20 % der Plasmen steigerten die NOS Aktivität in tEnd.1 und in J774-Zellen, wogegen HUVEC NOS-Aktivität unberührt blieb. Es kann daher geschlossen werden, dass Moleküle in den Plasmen vorhanden sind, die die iNOS-Expression beeinflussen. Der Effekt der Plasmen ist dabei weniger abhängig von der verwendeten Hämodialyseart als von der Progression des Nierenversagens. Die Korrelation wird darin gesehen, dass inhibierende Moleküle mit Fortschreiten des Nierenversagens im Plasma akkumulieren. Werden Plasmen nach einer Hämodialysesitzung verwendet, reduziert sich die inhibierte NOS-Aktivität von tEnd.1-Zellen, in einigen Fällen wird sie

sogar gesteigert. Im Ultrafiltrat hingegen sind die NOS-Aktivität reduzierenden Moleküle wie z.B. N^G-N^G-Dimethyl-L-Arginin gehäuft. Daher ist die Wirkung von urämischem Plasma auf die NOS-Aktivität ein Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Aktivatoren.

Passauer und Kollegen [98] belegen anhand von Injektion verschiedener Agenzien (Glycerolnitrat, L-Arginin, Acetylcholin, N-Monomethyl-L-Arginin (=LMA) und Norepinephrin) in die Brachialarterie und nachfolgender Messung des Vorderarmblutflusses mittels venöser Okklusions-Plethysmographie, dass bei Langzeit-Hämodialyse-Patienten mit Normotonie:

- 1- eine Vasodilatation nach Gabe von exogenem NO (Glycerolnitrat) reduziert ist,
- 2- die Stimulation der NOS (Acetylcholin) beeinträchtigt ist,
- 3- kein NOS-Substratmangel vorliegt (L-Arginin),
- 4- NO-Generationen bereits erhöht vorliegen.

Somit ist die Kapazität des NO-Systems, den vaskulären Tonus zu regulieren, bei Langzeit-Hämodialyse-Patienten reduziert. Darüber hinaus kann eine bereits erhöhte NO-Grundmenge bei HD-Patienten nach Oxidation zu Peroxynitrat formieren, was dann zu einer Endothelverletzung führen kann. Somit kann eine bereits im Zustand der Urämie vorliegende Endothelverletzung durch diesen Mechanismus verstärkt werden.

Neben den Peritonealmakrophagen scheinen Mesothelzellen ebenfalls NO zu produzieren nach Stimulation und können somit eine NO-Produktionsquelle während einer Peritonitis sein [99].

1.5. Untersuchungsziele

Zusammenfassend wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

I- *In vitro Untersuchungen:*

- Vitalitätstest von PMØ und HBM
- Einsatz von verschiedenen Zytokinen an PMØ und HBM im Hinblick auf die stimulierte NO-Produktion
 - a-im Peritonitis freien Intervall
 - b-während einer Peritonitis
- Einfluss von Inkubationszeit und verwendeten Puffer im Hinblick auf die NO-Produktion
- Zytokinfreisetzung von PMØ unter Einfluss verschiedener Stimulationsbedingungen und Inkubationszeiten
 - 1- Interleukin-6
 - 2- Interleukin-8

II- *In vivo Untersuchungen:*

- NO-Konzentration im Serum und im Dialysat (Peritonitis im Vergleich zum infektfreien Intervall)
- Basale und stimulierte NO-Konzentration von PMØ
- Expression der iNOS m-RNA von PMØ

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob erhöhte Mengen an NO bei CAPD-Patienten im Effluat in vivo während einer bakteriellen Peritonitis in vitro gemessen werden können und ob PMØ den potentiellen Ort der NO-Freisetzung darstellt. Außerdem wurden Peritonealmakrophagen sowohl während einer bakteriellen Peritonitis als auch im infektfreien Intervall isoliert, mit LPS und/oder INF- γ in vitro stimuliert und anschließend auf ihre NO-Produktion hin geprüft. Als Kontrollgruppen dienten Peritonealmakrophagen von CAPD-Patienten im infektionsfreien Intervall und andererseits Blutmonozyten als Vorläuferzellen von Makrophagen aus Buffy coats.

Darüber hinaus wurden NO-Konzentrationen im Dialysat und im Blutserum von PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis und im infektfreien Intervall verglichen.

Außerdem wurde die Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 von Peritonealmakrophagen als spezielle Funktion der host defense bei CAPD-Patienten ohne und mit bakterieller Peritonitis untersucht.

Schließlich war die Analyse der iNOS-mRNA-Expression von PMØ als Ausdruck der Immunantwort mittels der Polymerasekettenreaktion bei Peritonitis im Vergleich zu infektfreien Patienten während der Dialyse ein weiterer Hinweis für die Aktivierung der NOS bei PD Patienten.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Es wurden Peritonealdialysate von 6 CAPD-Patienten während einer akuten bakteriellen Peritonitis in einem Zeitraum von 48 Stunden nach Diagnosestellung untersucht (Tab.1). Die Dialysatflüssigkeiten wurden in Auslaufbeutel auf Eiswürfel in einer Styroporbox gesammelt. Als Kontrolle dienten die 4h-Verweildauer-Dialysate von 7 CAPD-Patienten im infektfreien Intervall. Klinische Daten der Patienten sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

2.1.1. Patientenstatistik

	Peritonitis	keine Peritonitis
Patientenanzahl	6	7
Alter (Jahre)	52 ± 15 (Range: 27-69 J.)	53 ± 16 (Range: 31-69 J.)
Geschlecht	4x weiblich, 2x männlich	1x weiblich, 6x männlich
PD seit (Jahre)	4,6 ± 3,5 (Range 2-10 J.)	4,2 ± 3,7 (Range 1-11 J.)
PD-Regime	3x CAPD (6l/d), 3x CCPD (8l/d)	4x CAPD (6l/d), 3x CCPD (8l/d)
Ursache der Niereninsuffizienz	2x diab. Nephropathie, 7x Glomerulonephritis, 4x idiopathisch	
Mikrobiologische Ursache der Perit.	4x koag. neg. Staphylokokken	/
	2x Streptokokken	/
Leukozyten im Dialysat (n/μl)	6.7 ± 2.5x10 ³ /μl	<100/μl
Rekonvaleszenz von der Peritonitis (Tage bis Leukozyten im Dialysat < 200/μl)	8 ± 2	/

Tabelle 1 : Klinische Daten der untersuchten CAPD-Patienten.

2.2. Materialien

Alle Chemikalien wurden von der Firma Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, UK) erworben. Ausnahmen siehe gesonderte Kennzeichnung. Alle Zellkulturflaschen, Multi-well Platten und 50ml Sammelgefäße wurden von der Firma Falcon (Becton-Dickinson UK Ltd, Oxford, UK) verwendet. Rekombinantes humanes IFN- γ stammte von der Firma Promega Corp. (Woods Hollow Road, USA). Die biologische Aktivität (ED₅₀) betrug weniger als 1ng/ml, gemessen an der HLA-DR Induktion an Kolon-25 Zellen mittels ELISA. LPS stammte von der Firma Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, UK). IL-6 und IL-8 lagen als Fertiglösungen vor, wurden bei -70°C gelagert und für jedes Experiment erneut aufgetaut.

2.3. Gewinnung von Peritonealdialysatflüssigkeit (PDF) und Plasma (P)

Es wurden Proben von den Peritonealdialysatflüssigkeiten von CAPD-Patienten (n=6) mit einer Peritonitis und von infektfreien PD-Patienten (Nachtbeutel) (n=7) gesammelt. Die Flüssigkeit wurde dabei in 50 ml vorgekühlte sterile Sammelgefäße (Falcon Tubes) gefüllt. Anschließend wurden diese zentrifugiert (bei 3000 X g für 10 Minuten), um Zellbestandteile zu entfernen. Es wurden Proben der Überstände jedes Patienten als Aliquots bei -70°C bis zur Messung gelagert.

Plasmaproben wurden in simultaner Weise gewonnen: Zunächst wurde venös gewonnenes Blut bei 500 X g für 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (= Plasma) wurde anschließend durch eine Centricon

Ultrafiltration-Membran mit einem Cut-off von 10,000 Dalton (Amicon, Beverly, USA) gefiltert. Diese Methode hat den Vorteil, dass eine effiziente Konzentrierung von kleinvolumigen makromolekularen Lösungen ermöglicht werden kann.

2.4. Zellisolierung

2.4.1. Isolierung und Kultivierung von humanen Peritonealmakrophagen (PMØ)

PMØ wurden aus den Peritonealdialysaten (Dianeal PD4 1,36% oder 3,86% Glucose) von CAPD-Patienten bei einer akuten bakteriellen Peritonitis ($3-6 \times 10^3$ Leukozyten/ μl Dialysat) und im infektionsfreien Intervall ($0.5-2 \times 10^2$ Leukozyten/ μl Dialysat) gewonnen. Die verwendeten Peritonealeffluat hatten dabei eine intraperitoneale Verweildauer von 4 Stunden. Das Effluat wurde in einem Auslaufbeutel, auf Eiswürfel in einer Styroporbox gekühlt, aufgefangen und in sterile 50ml ebenfalls vorgekühlte Röhrchen überführt und zentrifugiert ($3500 \times g$, 30 Minuten bei 10°C). Die Kühlung verhinderte eine Adhäsion der Peritonealmakrophagen an den Beutel und ermöglichte so eine größtmögliche Ausbeute der Zellzahl. Die Überstände wurden verworfen, die Zellpellets resuspendiert und in 50ml sterilem PBS Puffer (bei 4°C gekühlt) zusammengefügt. Insgesamt wurde eine zweimalige Resuspension der Zellen auf diese Weise durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in Kulturflaschen für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank zur Adhäsion überführt. Lymphozyten konnten erfolgreich durch erneutes Waschen mit PBS (Raumtemperatur) entfernt werden. Die Peritonealmakrophagen wurden mittels der Peroxidasefärbung ($>80\%$ positive Zellen) identifiziert. Die Zellvitalität wurde durch die Trypanblaufärbung ($95-98\%$ vitale Zellen) untersucht. In 24-well-Platten

wurden pro Well 2×10^6 Zellen mit jeweils 1,5ml PBS (Dulbecco's; Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) oder 1,5 ml RPMI, welche zuvor mit 10% bovinem Serumalbumin (BSA, Sera Lab Ltd), 1% L-Glutamin (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) und 1% Glukose (Merck, Darmstadt, Germany) angereichert wurden, aufgefüllt. Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.4.2. Isolierung und Kultivierung von humanen Blutmonozyten (HBM)

HBM wurden aus Buffycoats von der Blutbank (Transfusionsmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) gewonnen. Der Inhalt der Buffy Coats wurde mit PBS (Raumtemperatur) 1:1 verdünnt. Die Zellen wurden mittels eines Ficollgradienten (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, Dichte: 1,077g/ml) aus der Interphase isoliert: Es wurden 15 ml Ficoll und 25 ml der oben beschriebenen Lösung in 50 ml Tubes gefüllt und zentrifugiert (1000 X g 10 Minuten bei 20°C). Nach der Zentrifugation bildete sich zwischen dem Ficoll und dem Serum/PBS-Gemisch die Phase mononukleärer Zellen. Diese Phase wurde vorsichtig abpipettiert, mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert (350 X g, 10min bei 20°C). Erneute Dekantierung, Resuspension mit PBS und schließlich Zentrifugation (350 X g, 10 Minuten bei 20°C) folgten. Der Zellpellet wurde mit PBS und den oben aufgeführten Zusätzen in 750ml Kulturflaschen zur Adhäsion überführt und für 1,5 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Kulturflaschen dreimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Dies gewährleistet die Adhäsion der zu untersuchenden Monozyten, aber auch die Entfernung anderer Zellen (Lymphozyten etc.).

Die gereinigten Monozyten wurden durch leichtes Schütteln von dem Boden gelöst, in 50ml Tubes umgefüllt und zweimal zentrifugiert (350Xg,

10 min bei 20°C). Die Zellvitalität wurde durch die Trypanblaufärbung (95-98% vitale Zellen) ermittelt.

2.5. Identifizierung und Vitalitätsbestimmung der Peritonealmakrophagen und Blutmonozyten

Peritonealmakrophagen bzw. Blutmonozyten wurden mittels der Peroxidasefärbung identifiziert. Die Zellvitalität wurde mit der Trypan-Blau Färbung untersucht.

2.5.1 Peroxidase Färbung

Die Peroxidase-Färbung wurde modifiziert nach Kaplow [57] durchgeführt. Zellsuspensionsausstriche wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend für eine Minute in einer Lösung, bestehend aus 10 Teilen einer 37%igen Formaldehyd-Lösung und 90 Teilen reinem Ethanol, fixiert. Daraufhin wurden die Präparate für 30 Sekunden in Leitungswasser gewaschen. Die so fixierten Objektträger wurden für 2 Minuten in einer Färbelösung (100ml 30%igem Ethanol 0,3 g Benzidinedihydrochloride, 1ml 0,132M $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g Natriumacetat, 0,7ml 3% H_2O_2 , 1,5ml 1 N Natriumhydroxide und 0,05g Safranin O) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen in Leitungswasser wurden die Präparate bei Raumtemperatur für 12 Stunden getrocknet. Auf diese Weise wurden Peritonealmakrophagen und Blutmonozyten im Gegensatz zu anderen Zellen dunkelrot angefärbt.

Abbildung 2: Identifikation von Peritonealmakrophagen mittels der Peroxidase Färbung, modifiziert nach Kaplow. Peritonealmakrophagen erscheinen dunkelrot und können so von anderen Zellen unterschieden werden.

2.5.2. Trypan-Blau Färbung

Trypan-Blau (Seromed) färbt nur tote Zellen nach Diffusion durch die geschädigte Zellmembran blau an, indem es als saurer Farbstoff eine hohe Affinität zu Proteinen aufweist. Vitale Zellen, die über eine intakte Zellmembran verfügen, werden demnach nicht angefärbt. Für die Färbung wurden 0,5ml einer 0,5% Trypan-Blau-Lösung (Seromed, Pollenfeld, Germany) mit 0,5ml PBS-Puffer gemischt. 500µl dieser Lösung wurden mit 93µl Zellsuspension gemischt und für 5 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurde in einer Neubauer-Zählkammer das

Verhältnis blau gefärbte Zellen zur Gesamtzahl aller gezählter Zellen bestimmt. Hierfür wurden 200 Zellen ausgezählt.

2.6. Stimulation von Peritonealmakrophagen bzw. Blutmonozyten

In 24-well-Platten wurden pro well 2×10^6 Zellen (PMØ) bzw. 5×10^6 Zellen (HBM) mittels der Zählkammer ermittelt, mit jeweils 1,5ml PBS (Dulbecco's; Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) oder 1,5ml RPMI, welche zuvor mit 10% bovinem Serumalbumin (BSA, Sera Lab Ltd), 1% L-Gutamin (Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) und 1% Glukose (Merck, Darmstadt, Germany) angereichert wurden, aufgefüllt. Die Zellzahl wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. PMØ wurden so im Brutschrank bei 37°C in einer angefeuchteten mit 5% angereicherten CO₂ Atmosphäre für 6, 12, 24 und 48 Stunden ohne Stimulation und mit Zusatz verschiedener Konzentrationen an LPS (1ng-10µg/ml) und IFN-γ (10-1000U/ml) und einer Kombinationsreihe aus beiden inkubiert. Die Überstände wurden nach Ablauf der Inkubationszeit abpipettiert, zur Entfernung von Dialysatresten zentrifugiert und jeweils bei -70°C bis zur Messung gelagert.

2.7. Nitrit (NO₂)-Bestimmung im Dialysat und Plasma

Die Nitrit-Konzentration als ein Endprodukt von NO wurde in den Überständen kolorimetrisch mit Hilfe der Griess Reagenz, wie zuvor bereits genau beschrieben [100-101], ermittelt. Zusammengefaßt wurden Aliquots mit dem Griess Reagenz (Griess Reagenz I: 1% Sulfanilamid in 4N HCl, Griess Reagenz II: 0.1% N-1-Naphthylethylendiamindihydrochlorid in

2.5% H₃PO₄) bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert, bis die Lösung einen pinkroten Farbumschlag zeigte. Die Absorption wurde photometrisch bei 550nm mittels eines ELISA-Reader gemessen. Die NO₂-Konzentration der Überstände wurde anhand ihrer Absorption bei jeder Messung mittels einer Natriumnitrit-Standardreihe ermittelt (Sensitivität: 0.5µmol/l, inter-Assay Varianz <5%).

2.8. Zellproteinbestimmung nach Bradford

Der Zellproteingehalt wurde durch eine modifizierte Bradford-Methode mittels des Bio-Rad Protein Assay (Bio- Rad, München, Germany) analysiert. Als Standardreihe diente ein bovines Serumalbumin (Sigma). Es basiert auf dem Prinzip, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Bindung mit einem Protein von 465nm nach 595nm verschiebt, welches photometrisch gemessen werden kann. Für die Standardkurve wurden 6 verschiedene Proben benutzt. Neben destilliertem Wasser als „blank“ wurden 5 Standardproben mit 5, 10, 20, 30 und 40µg Bovinen Serum Albumin/ml Aqua dest. hergestellt, die bei jedem Ansatz mitgemessen wurden. Zunächst wurden die Zellen mit 0,1molarer NaOH-Lösung lysiert, in 96-well Platten 1:4 mit Aqua dest. verdünnt und mit einer 30% Bradford-Lösung gemischt. Die Extinktion bzw. die Proteinnmengen wurden durch den ELISA-Reader (anthonos 2000, anthonos mikrosysteme GmbH, Köln, Deutschland) bei einem 620nm Filter ermittelt. Wiederholte Zellzählungen (Neubauer Zählkammer) zeigten, dass 1µg Zellprotein äquivalent mit 1.16×10^4 Zellen (n=6) im Falle der PMØ und 1.69×10^4 Zellen (n=6) für HBM war. Die Einheit der NO₂ Konzentration ist in µmol/µg Zellprotein wiedergegeben.

2.9. Colorimetrische Testverfahren

2.9.1. MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Maß für die Zellvitalität der zu untersuchenden Zellen. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid) ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, dessen Tetrazoliumring durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen gespalten wird. Aus dem schwach gelben MTT entsteht das alkohollösliche dunkelbraune Formazan, welches photometrisch bei 570nm Messungfilter und 620nm Referenzfilter gemessen werden kann. MTT wurde in einer Konzentration von 8mg/ml in PBS gelöst und anschliessend steril filtriert (Sartorius Minisart Filter, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Die Haltbarkeit betrug bei einer lichtgeschützten Lagerung bei 4°C einen Monat. Der MTT-Test wurde eingesetzt, um einerseits die Vitalität der Peritonealmakrophagen bzw. der Blutmonozyten zu bestimmen. Andererseits sollte ein geeignetes Medium sowie adäquate Inkubationszeiten für die folgenden Versuchsreihen gefunden werden.

2.10. Zytokinmessung

2.10.1. Interleukin-6 Bestimmung

Der Elisa für Interleukin-6 wurde mit dem Duoset (Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA) durchgeführt.

Eine 96-Well-Mikrotiter Platte (F 96 Maxis, R & D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland) wurde mit 100µl/Well des ersten Antikörpers bei einer Konzentration von 2,5µg Antikörper/ml „coating buffer“, beschichtet. Nach fünfmaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurden 250µl Blocking

Puffer in jedes Well pipettiert und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde der Blocking Puffer dekantiert, 100µl Standard bzw. Proben/Well pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden alle Wells mit 100µl des zweiten Antikörpers (Konzentration: 1 µg/ml) pro Well beschichtet, die Platte abgedeckt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100µl einer Streptavidin HRP Lösung pro Well pipettiert und für 15min bei 37°C inkubiert. Anschliessend konnten 100µl/Well des Substrats nach erneutem Waschen hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert werden. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl/Well Stop-Lösung beendet und bei 450nm im ELISA-Reader gemessen (Sensitivität: 3pg/ml, Variationskoeffizient<5%).

2.10.2. Interleukin-8 Bestimmung

Die Interleukin-8 Bestimmung entsprach der Vorgehensweise der oben beschriebenen IL-6 Messung (Sensitivität: 0.30pg/ml, Variationskoeffizient<5%).

2.11. RT-PCR zur Bestimmung der iNOS-mRNA

Die Gesamt-RNA wurde aus 5×10^6 kultivierten Zellen mittels eines Trizolreagenzes (Gibco BRL) extrahiert. Bei den Zellen handelte es sich um PMØ während einer Peritonitis, isoliert aus den Peritonealeffluaten, und PMØ nach Stimulation mit 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ nach 24 Stunden

Inkubation in PBS mit Zusätzen. Außerdem wurde gleichermaßen mit HBM als Kontrollzellen verfahren. Für den RT-PCR assay wurde 1 µg der Gesamt-RNA revers in die cDNA transkribiert. 10µl der revers-transkribierten RNA wurden mittels der Polymerasenkettenreaktion (PCR) vervielfacht, wobei 25 pmol von jedem Primer im PCR Puffer verwendet wurden. Der adäquate Primer für iNOS war 5': CCATGCTGGCAGGAACGAGAACGC und der Gegen-Primer war 3': GAATTGTTTGTTCAGGTCTTCGAGC, welcher ein 366 bp Produkt lieferte. Die Amplifikationsbedingungen waren: 94°C für 6 min während eines Zyklus; 94°C für 1min, 65°C für 1min, 72°C für 1min für 40 Zyklen; 72°C 10min für ein Zyklus (Trio-Thermoblock, Biometra). Aliquots der PCR Produkte wurden anschließend mittels der Elektrophorese auf einem 1% Agarosegel separiert, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter der UV-Lampe photographiert.

2.12. Statistische Auswertung:

Auf Signifikanz geprüft wurde mittels des *t*-testes für ungepaarte Proben und des Student's *t*-testes mit einem Alphafehler von weniger als 0.05. Alle Werte im Text sind als Mittelwert \pm sd angegeben.

3. Ergebnisse:

I- In vitro Untersuchungen:

- **Vitalitätstest von PMØ und HBM mittels des MTT-Tests**

Zur Vitalitätsbestimmung wurden Peritonealmakrophagen und humane Blutmonozyten sowohl in PBS+Zusätzen als auch in Krebspuffer+Zusätzen für 0, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert, um ein geeignetes Medium sowie adäquate Inkubationszeiten für weitere Versuchsansätze zu finden. Es zeigte sich dabei für beide Medien und Zellarten gleichermaßen zum einen ein stetiger prozentualer Abfall der vitalen Zellen nach Ablauf von 48 beziehungsweise 72 Stunden Inkubationszeit. Zum anderen waren die Werte der vitalen Zellen in beiden Medien nach Ablauf jeder Inkubationszeit zahlenmäßig analog. Wir entschieden uns aufgrund dieser Erkenntnisse zum Gebrauch von PBS sowie Inkubationszeiten von 6 bis 48 Stunden für alle weiteren Versuchsreihen. Im Falle der Peritonealamakrophagen zeigten sich im Detail in PBS nach 24 Stunden (Abb.1) $69 \pm 0.13\%$ und $57 \pm 0.11\%$ nach 48 Stunden vitale Zellen, welche gegenüber 0 Stunden signifikant waren. Ähnlich waren Zellen in Krebspuffer nach 24 Stunden $69 \pm 0.11\%$, nach 48 Stunden signifikant vital.

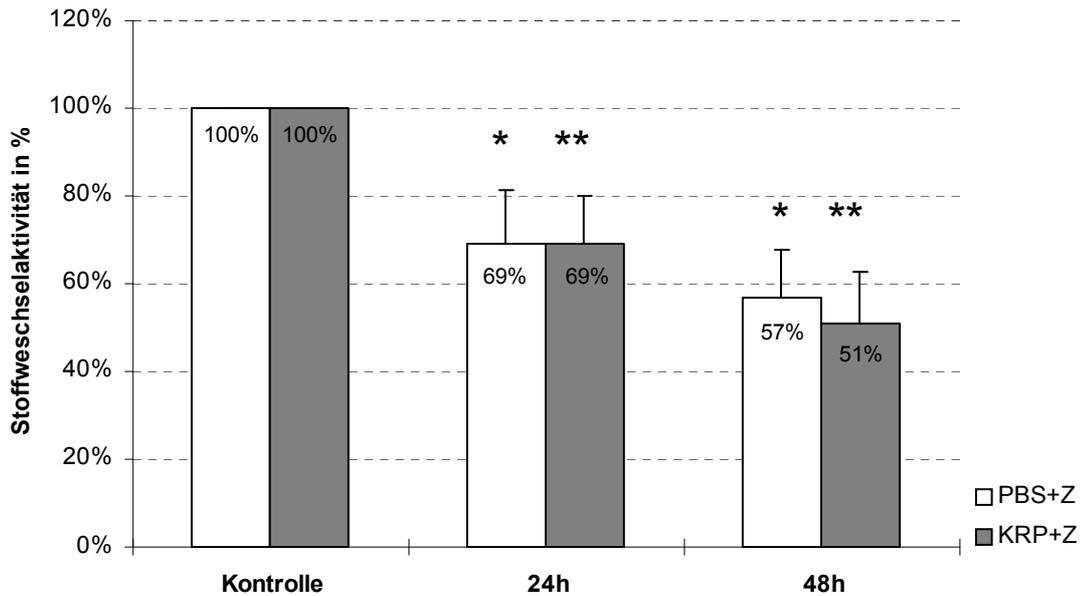


Abbildung 3: Darstellung des MTT- Tests zur Vitalitätsbestimmung von PMØ (n=6) in Phosphatpuffer (PBS) bzw. Krebspuffer (KRP) und Zusätzen nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit.* bedeutet Signifikanz gegenüber der Kontrolle in PBS, die auf 100% gesetzt wurde; ** bedeutet Signifikanz gegenüber der Kontrolle in KRP, die auf 100% gesetzt wurde; $p < 0.05$.

Im Falle der Blutmonozyten zeigten sich in PBS nach 24 Stunden (Abb.2) $71 \pm 0.12\%$, nach 48 Stunden $62 \pm 0.06\%$ vitale Zellen und nach 72 Stunden $52 \pm 0.08\%$, welche gegenüber 0 Stunden signifikant waren. Gleichmaßen waren in Krebspuffer nach 24 Stunden $76 \pm 0.09\%$, nach 48 Stunden $72 \pm 0.11\%$ und nach 72 Stunden $56 \pm 0.08\%$ Zellen signifikant vital.

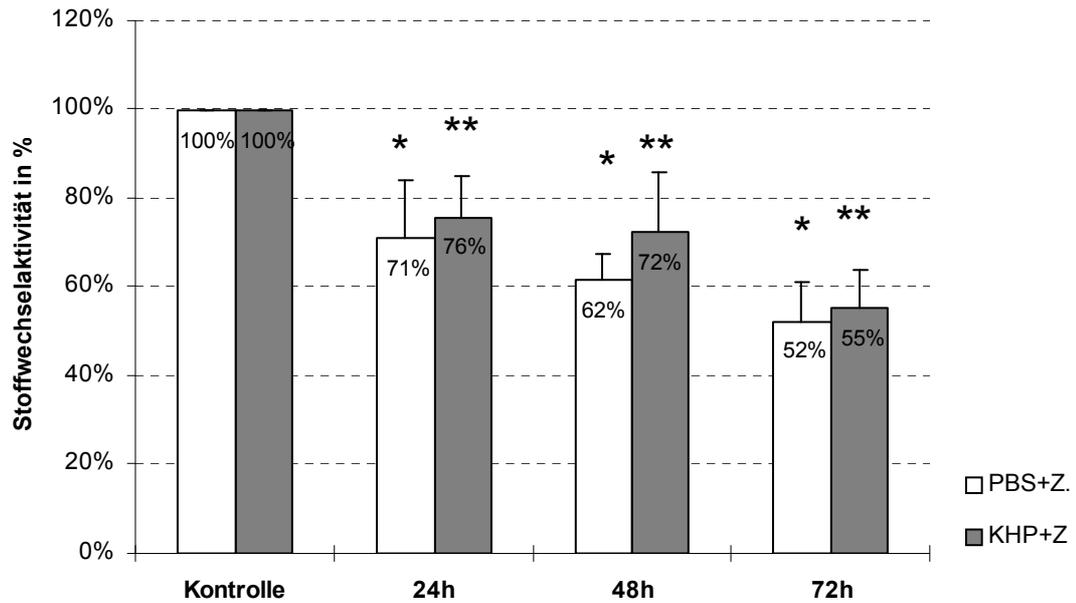


Abbildung 4: Darstellung des MTT-Tests zur Vitalitätsbestimmung von humanen Blutmonozyten (HBM) (n=6) in PBS bzw. KRP und Zusätzen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation. * bedeutet Signifikanz gegenüber Kontrollzellen in PBS, die auf 100% gesetzt wurden, inkubiert, ** bedeuten Signifikanz gegenüber Kontrollzellen in KRP, die auf 100% gesetzt wurden, inkubiert; $p < 0.05$.

- **Einsatz von verschiedenen Zytokinen an PMØ und HBM im Hinblick auf die NO-Freisetzung von a) im Peritonitis-freien Intervall und b) im Falle einer Peritonitis**

Beide Zellarten wurden mit LPS und $\text{INF-}\gamma$ stimuliert. Es wurden separate Konzentrationssteigerung der einzelnen Zytokine als auch eine Kombinationsreihe angewendet:

1. 1ng/ml LPS
2. 100ng/ml LPS
3. 1000ng/ml LPS
4. 10 μg /ml LPS

5. 15U/ml INF- γ
6. 60U/ml INF- γ
7. 250U/ml INF- γ
8. 1000U/ml INF- γ
9. 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ
10. 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ
11. 100ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ
12. 100ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ
13. 100ng/ml LPS + 1000U/ml IFN- γ
14. 10 μ g/ml LPS + 15U/ml IFN- γ

Eine Steigerung der LPS Konzentration zwischen 1-100ng/ml führte zu einer deutlichen Steigerung der NO-Freisetzung im Vergleich zur Ausgangssituation bei beiden Zellarten (signifikant für HBM, nicht signifikant für PM \emptyset). Eine Konzentration zwischen 1000ng und 10 μ g/ml dagegen erhöhte den NO-Ertrag nur geringfügig.

Eine Stimulation mit INF- γ alleine inhibierte die NO-Freisetzung bei den PM \emptyset , während sie bei den HBM zu keiner wesentlichen Veränderung der Ausgangssituation führte, nicht signifikant.

In der Serie der Kombinationen aus beiden Zytokinen konnte eine erhöhte und signifikante NO-Freisetzung im Falle der HBM durch 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ > 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ > 100ng/ml LPS + 250 U/ml IFN- γ , im Falle der PM \emptyset erbrachten 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ > 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ erhöhte, jedoch nicht signifikante NO Erträge.

PM \emptyset von peritonitisfreien Patienten wurden aufgrund der geringen Zellzahlausbeute mit dem Parameter, welcher nach unserer Methode eine

hohe NO Freisetzung erzielte, nämlich 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ , stimuliert.

- **Einfluss von verschiedenen Inkubationszeiten und Puffern auf die NO-Freisetzung von PM \emptyset und HBM a) im peritonitisfreiem Intervall und b) im Falle einer Peritonitis**

PM \emptyset während einer Peritonitis und HBM wurden 6, 12, 24 und 48 Stunden in PBS mit Zusätzen inkubiert.

- **peritonitisfreier Intervall**

Aufgrund der oben genannten niedrigen Zellzahlausbeute wurden PM \emptyset im peritonitisfreien Intervall 24 Stunden in PBS mit Zusätzen inkubiert.

Eine Versuchsreihe wurde an PM \emptyset im Falle einer Peritonitis 24 Stunden in RPMI mit Zusätzen angelegt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit ließen sich zwar keine signifikanten Nitritkonzentrationen messen. Doch eine Tendenz ließ sich verzeichnen (Abb.4). Eine Steigerung der LPS-Konzentration zeigte eine Steigerung der Nitrit-Konzentration, wobei eine Stimulation mit 1000ng/ml LPS einen maximalen Ertrag erbrachte (1ng/ml LPS: $0.002 \pm 0.003 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, 100ng/ml LPS: $0.008 \pm 0.013 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, 1000ng/ml LPS: $0.017 \pm 0.036 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.0003 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; nicht signifikant). Eine alleinige Stimulation mit IFN- γ sowie eine Stimulation mehr als 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS inhibierten dagegen die NO-Produktion. In der Gruppe der Kombinationen erbrachten die Stimulationen mit 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ und 1ng/ml LPS + 25U/ml IFN- γ positive, nicht signifikante NO-Erträge ($0.003 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein und $0.017 \pm 0.032 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein

versus $0.0003 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; nicht signifikant). Insgesamt erwies sich RPMI als Medium zur Kultivierung und Messung von Nitrit aufgrund seines eigenen Nitrit-Hintergrundes als ungeeignet. Aus diesem Grunde wurde nur noch PBS und Zusätze als Medium für weitere Versuchsreihen verwendet.

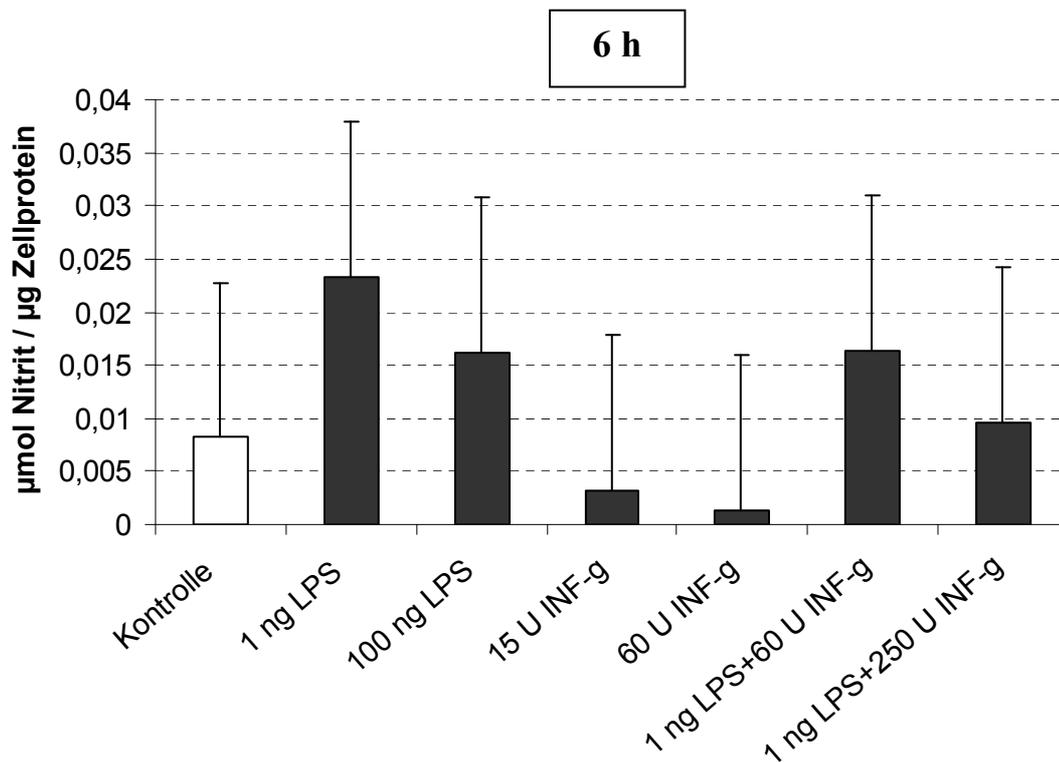


Abbildung 5: Darstellung der NO-Konzentration in den Überständen der PMØ, isoliert aus den Effluaten der PD-Patienten, während einer bakteriellen Peritonitis (n=6). Die Inkubation erfolgte in PBS für 6 Stunden. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng – 10µg/ml), IFN-γ (15U – 1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Die Werte sind \pm Standardabweichung wiedergegeben. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, $p < 0.05$.

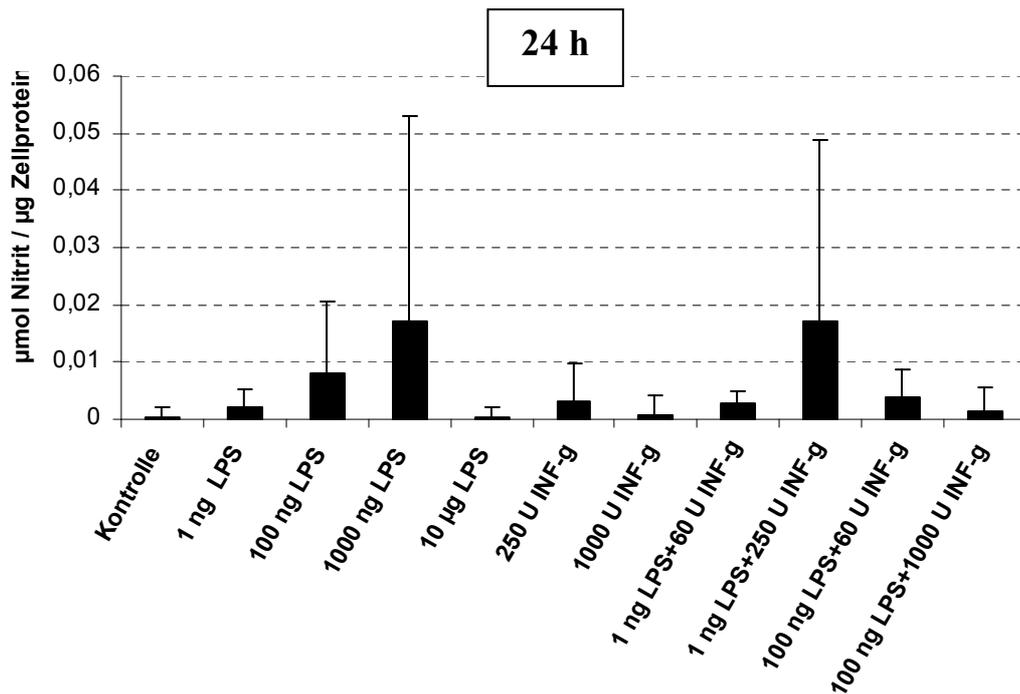


Abbildung 6: Darstellung der Nitrit-Produktion von den Überständen der PMØ, isoliert aus den Effluaten n=6 PD-Patienten, während einer bakteriellen Peritonitis nach Stimulation mit LPS (1ng – 10µg/ml), IFN-γ (15U – 1000U/ml) und verschiedener Kombinationen aus beiden. Die Inkubationszeit beträgt 24 Stunden in RPMI und Zusätzen. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen kultiviert. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber der Kontrolle, $p < 0.05$.

- **Humane Blutmonozyten**

Im Falle von HBM war eine LPS Stimulation von 1ng/ml ausreichend genug, um eine signifikante NO-Ausbeutung nach 6 Stunden (0.024 ± 0.008 µmol/µg Zellprotein; $p < 0.05$), 12 Stunden (0.017 ± 0.012 µmol/µg Zellprotein; $p < 0.05$), 24 Stunden (0.032 ± 0.015 µmol/µg Zellprotein; $p < 0.05$) und 48h Stunden (0.037 ± 0.028 µmol/µg Zellprotein; $p < 0.05$) zu erzielen. Dabei lagen die NO-Konzentrationen der stimulierten Zellen klar über den der Kontrollzellen (Abb.3). Eine Stimulation mit 100 ng/ml LPS konnte weiterhin eine signifikante NO-Produktion für alle Inkubationszeiten verzeichnen (6 Stunden: 0.028 ± 0.008 µmol/µg

Zellprotein; 12 Stunden: $0.032 \pm 0.012 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 24 Stunden: $0.033 \pm 0.015 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 48 Stunden: $0.03 \pm 0.028 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; $p < 0.05$). Auch hier zeigten die Konzentrationen der stimulierten Zellen höhere Werte als die der Kontrollzellen an. Im Falle der erstgenannten Stimulation (1 ng/ml LPS) zeigte die NO-Produktion nach 6 Stunden einen Abfall, um dann nach 24 und 48 Stunden stetig anzusteigen. Anders war es nach der Stimulation mit 100 ng/ml LPS. Hier zeigte sich ein Abfall des Nitrits erst nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden, während es zuvor stetig angestiegen war.

Eine Konzentration über $1 \mu\text{g/ml}$ LPS erzielte keine weiter gesteigerte NO-Produktion. Im Gegenteil es ließ sich eine Suppression feststellen.

Stimulationsreihen mit verschiedenen IFN- γ Konzentrationen alleine ergaben wenig steigerungsfähige, nicht signifikante NO-Produktionen. Ein Maximum an Produktion von Nitrit zeigte die Stimulation mit $250 \text{ IFN-}\gamma$ nach 6 Stunden im Vergleich zu den Kontrollzellen ($0.019 \pm 0.014 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.010 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; nicht signifikant).

Verschiedene Kombinationen aus LPS und IFN- γ wurden getestet. Dabei waren folgende 3 Stimulationen bezüglich ihrer NO-Produktion bei allen Inkubationszeiten signifikant:

1. **1 ng/ml LPS + 60 U/ml IFN- γ** (6 Stunden: $0.029 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 12 Stunden: $0.034 \pm 0.012 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 24 Stunden: $0.031 \pm 0.009 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 48 Stunden: $0.028 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; $p < 0.05$ versus Kontrollzellen)
2. **1 ng/ml LPS + 250 U/ml IFN- γ** (6 Stunden: $0.026 \pm 0.007 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 12 Stunden: $0.025 \pm 0.007 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 24 Stunden: $0.032 \pm 0.015 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 48 Stunden: $0.025 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; $p < 0.05$ versus Kontrollzellen) und

3. **1 ng/ml LPS + 250 U/ml IFN- γ** (6 Stunden: $0.015 \pm 0.013 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 12 Stunden: $0.014 \pm 0.014 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 24 Stunden: $0.015 \pm 0.013 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 48 Stunden: $0.013 \pm 0.008 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; $p < 0.05$ versus Kontrollzellen).

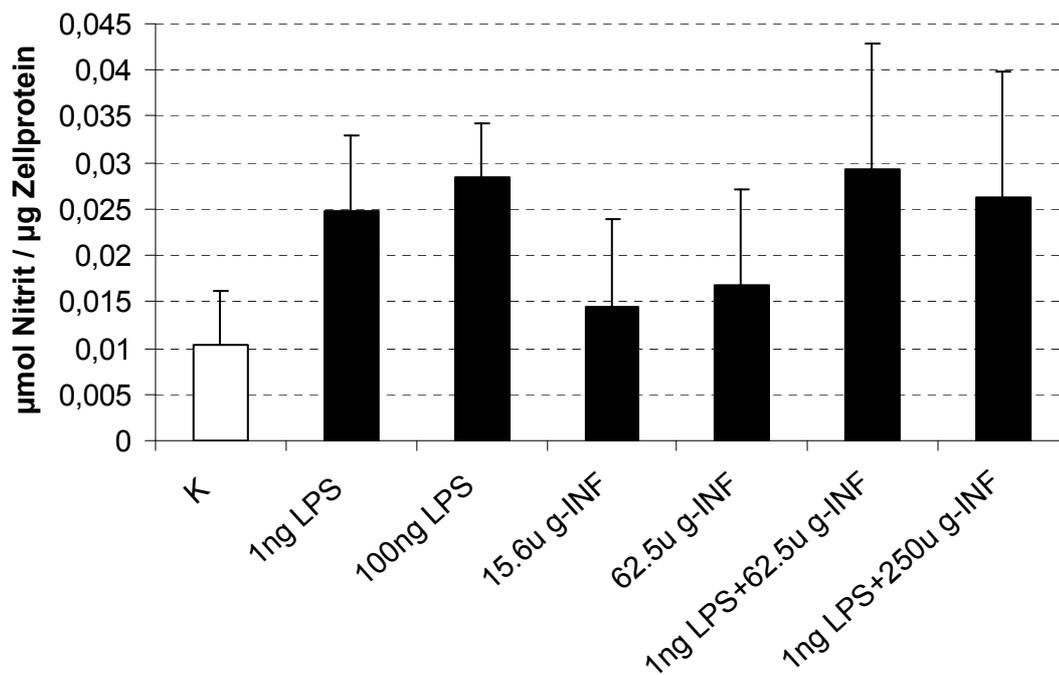


Abbildung 7: Darstellung der Nitrit-Konzentration in den Überständen von HBM als Vorläuferzellen von PMØ, isoliert aus n=6 Buffy coats. Die Inkubation erfolgte in PBS und Zusätzen für 6 Stunden. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN- γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, $p < 0.05$.

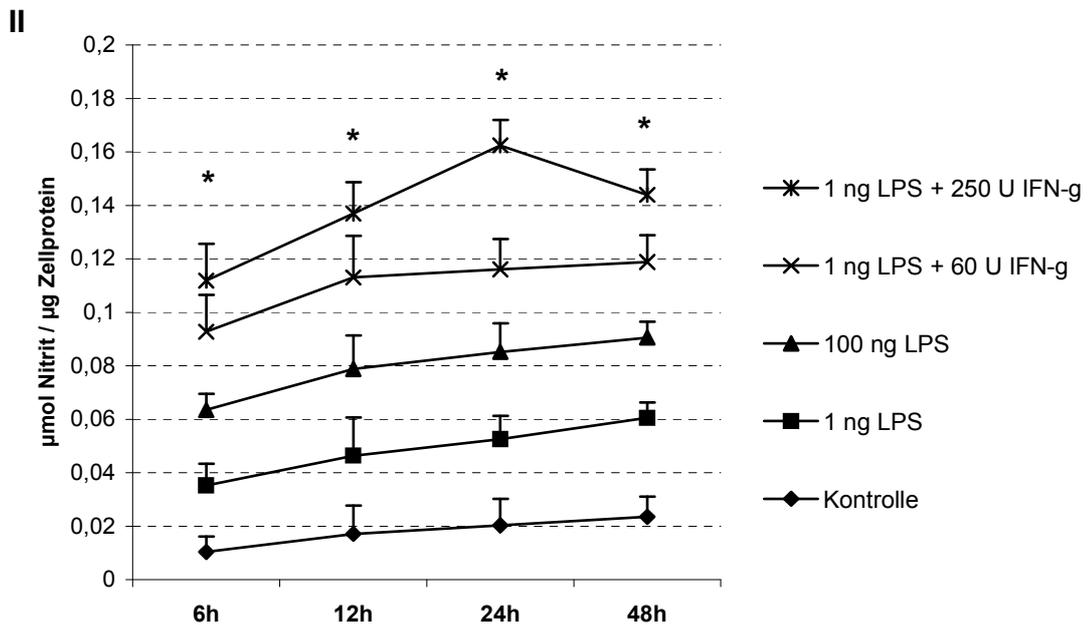
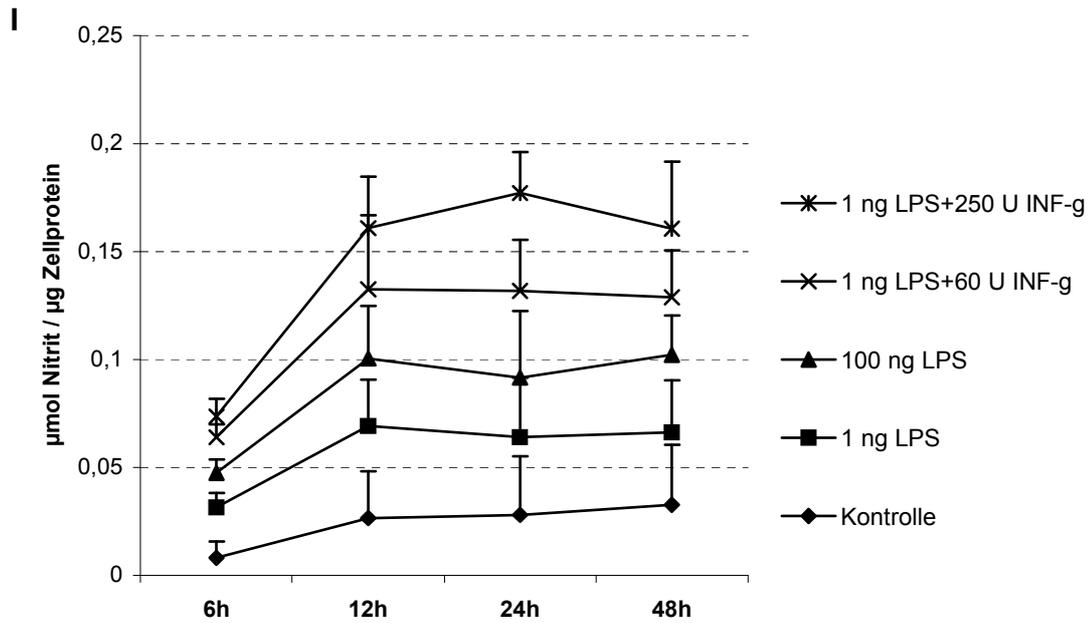


Abbildung 8: Gegenüberstellung der NO-Freisetzung von PMØ (I), isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis, und HBM (II), isoliert aus n=6 Buffy coats, in einem Zeitdiagramm (6-48 Stunden Inkubationszeit). Die Inkubation fand in PBS mit Zusätzen statt. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen

aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Die Werte sind \pm Standardabweichung wiedergegeben. * bedeutet Signifikanz gegenüber nicht stimulierten Kontrollzellen; $p < 0.05$.

- **Zytokinfreisetzung von PMØ unter Einfluss verschiedener Stimulationsbedingungen und Inkubationszeiten**

1) Interleukin-6

Peritonealmakrophagen von CAPD-Patienten während einer Peritonitis produzieren nach jeweils 6, 12, 24 und 48 Stunden nach folgenden Stimulationen signifikante Mengen an Interleukin-6 (Abb.14-17):

1. 1ng/ml LPS
2. 100ng/ml LPS
3. 1000ng/ml LPS
4. 10 μ g/ml LPS
5. 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ
6. 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ
7. 100ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ
8. 100ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ
9. 100ng/ml LPS + 1000U/ml IFN- γ
10. 10 μ g/ml LPS + 15U/ml IFN- γ

Während LPS alleine sowie in Kombination mit IFN- γ in steigender Konzentration die IL-6 Produktion signifikant steigern kann, führt IFN- γ alleine zur einer Inhibition der IL-6 Freisetzung. Dabei liegen im Falle der Signifikanzen die Werte der stimulierten Peritonealmakrophagen zahlenmäßig über die der Kontrollzellen. Außerdem vermag die Stimulation mit LPS alleine in steigender Konzentration Mengen an IL-6 zu produzieren, die deutlich über den Mengen liegen, wenn eine

Stimulation aus einer Kombination aus beiden angesetzt wird. Diese zeigen zwar einen stetigen Produktionsanstieg nach steigender Konzentration, übertreffen dennoch nicht die IL-6 Mengen der durch LPS alleine stimulierten Zellen.

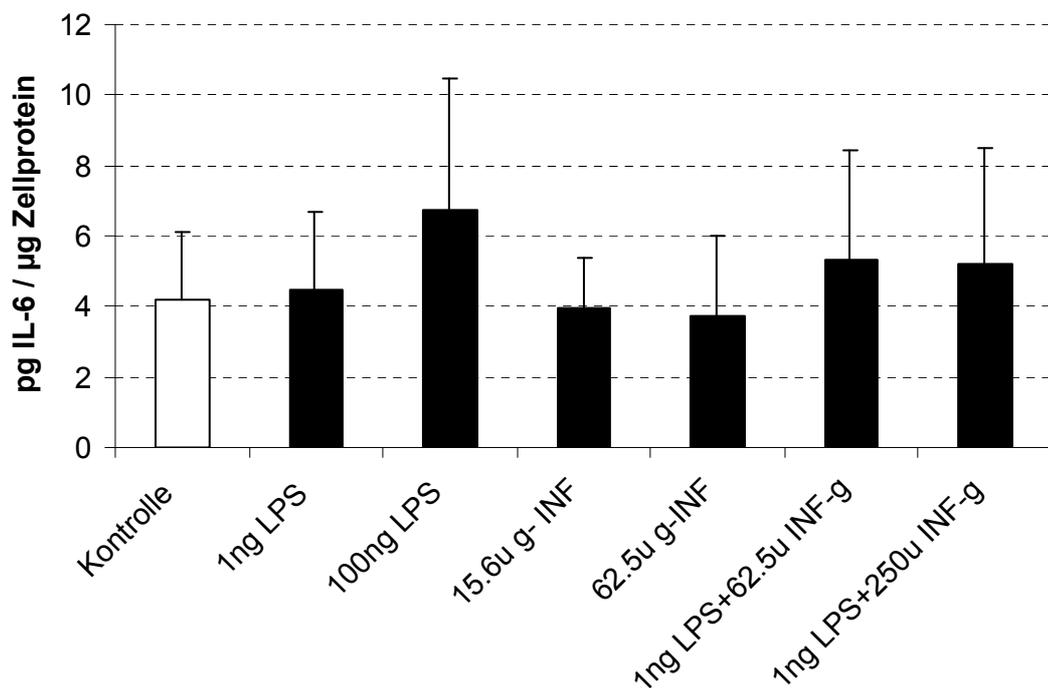


Abbildung 9: Darstellung der IL-6-Freisetzung von PMØ, isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis. Die Freisetzung wurde nach 6 und 12 Stunden Inkubation (I-II) in PBS gemessen. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Die Werte sind ± Standardabweichung wiedergegeben. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, p<0.05.

2) Interleukin-8

Peritonealmakrophagen von CAPD-Patienten während einer Peritonitis produzieren nach jeweils 6, 12, 24 und 48 Stunden nach folgenden Stimulationen signifikante Mengen an Interleukin-8 (Abb.18-21):

1. 1ng/ml LPS
2. 100ng/ml LPS
3. 1000ng/ml LPS
4. 10 μ g/ml LPS
5. 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ
6. 100ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ
7. 100ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ
8. 100ng/ml LPS + 1000U/ml IFN- γ
9. 10 μ g/ml LPS + 15U/ml IFN- γ

Dies entspricht in etwa der signifikanten Stimulationsreihe von IL-6. Einziger Unterschied ist, dass die Stimulation 1ng/ml LPS+250U/ml IFN- γ nicht in dieser Liste aufgrund fehlender Signifikanz mitaufgeführt werden kann. Aber auch hier ist die Tatsache gültig, dass LPS alleine sowie in Kombination mit IFN- γ in steigender Konzentration die IL-8 Produktion signifikant steigern kann. IFN- γ alleine führt zu einer Inhibition der IL-8 Freisetzung. Dabei liegen im Falle der Signifikanzen die Werte der stimulierten Peritonealmakrophagen zahlenmäßig über den der Kontrollzellen. Außerdem vermag die Stimulation mit LPS alleine in steigender Konzentration Mengen an IL-8 zu produzieren, die deutlich über den Mengen liegen, wenn eine Stimulation aus einer Kombination aus beiden angesetzt wird. Diese zeigen zwar auch einen stetigen Produktionsanstieg nach steigender Konzentration, übertreffen dennoch

nicht die IL-8 Mengen der durch LPS alleine stimulierten Zellen. Auffallend ist, dass sich die IL-8 Mengen aller Stimulationen nach 12 beziehungsweise nach 24 Stunden verdoppeln, um sich dann nach 48 Stunden zu verdreifachen

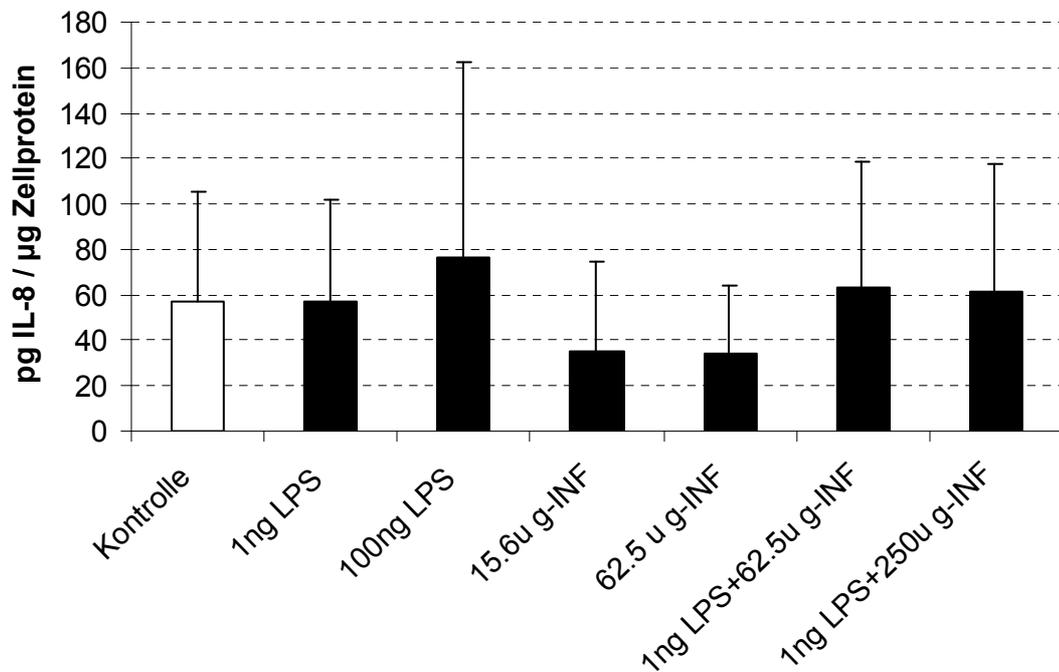


Abbildung 10: Darstellung der IL-8-Freisetzung von PMØ, isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten, während einer bakteriellen Peritonitis. Die Freisetzung wurde nach 6 Stunden Inkubation in PBS gemessen. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng– 0µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Die Werte sind ± Standardabweichung wiedergegeben. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, p<0.05.

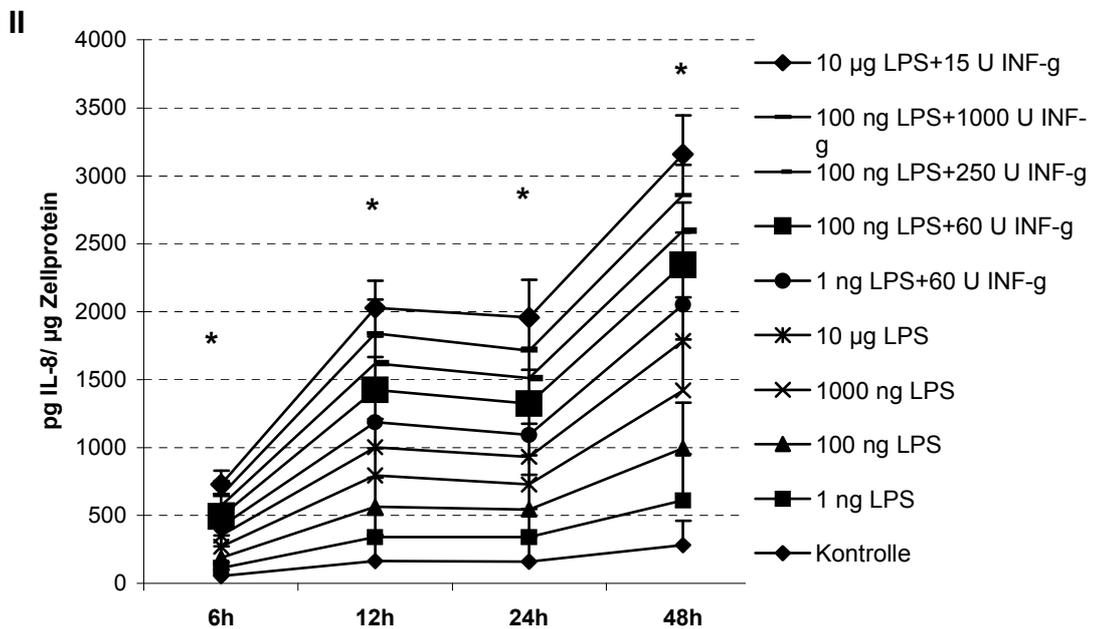
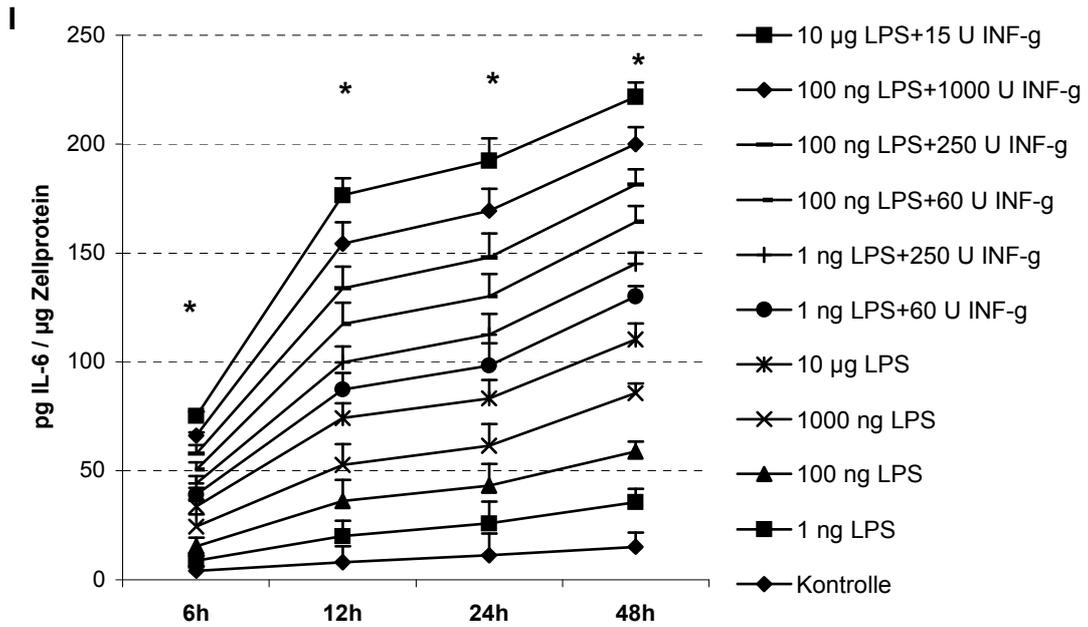


Abbildung 11: Gegenüberstellung der Interleukin-6 (I) und Interleukin-8 Freisetzung (II) von PMØ, isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis in einem Zeitdiagramm (6-48 Stunden Inkubationszeit). Die

Inkubation fand in PBS mit Zusätzen statt. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Die Werte sind ± Standardabweichung wiedergegeben.

* bedeutet Signifikanz gegenüber nichtstimulierten Kontrollzellen; $p < 0.05$.

3.2. In vivo Untersuchungen

- **NO-Konzentration im Plasma (P) und im Dialysat (D)
(Peritonitis im Vergleich zum infektfreien Intervall)**

Die NO-Konzentration von CAPD Patienten im infektfreien Intervall betrug im Blutplasma $5.95 \pm 1.85 \mu\text{mol/l}$ und $2.59 \pm 0.89 \mu\text{mol/l}$ im Peritonealdialysat (Abb. 3). Das Verhältnis von Dialysat zu Plasma ergab einen Quotienten < 1 . Im Falle einer Peritonitis kehrte sich dieses Verhältnis zugunsten des Dialysates um. Die NO-Konzentration im Dialysat war mit $3.97 \pm 1.33 \mu\text{mol/l}$ höher als die Plasma-Konzentration mit $3.08 \pm 1.05 \mu\text{mol/l}$.

Zusammengefaßt fand sich ein deutlich höheres signifikantes Dialysat/Plasma (D/P) Verhältnis an Nitrit-Konzentration während einer Peritonitis verglichen zum infektfreien Intervall (Peritonitis $D/P = 1.3$; ohne Peritonitis $D/P = 0.4$, $p < 0.01$).

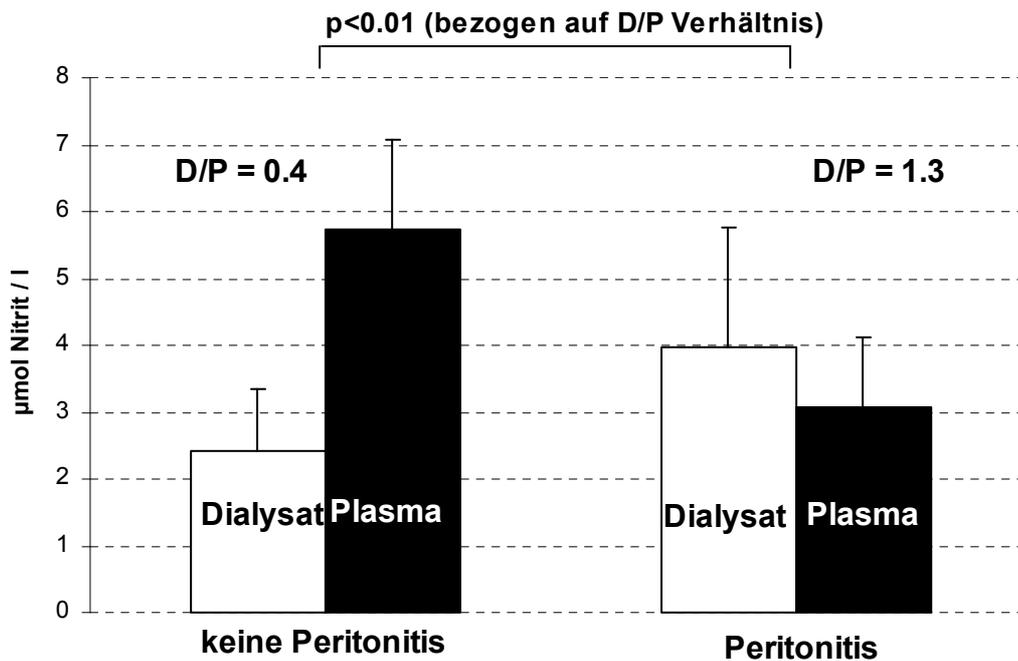


Abbildung 12: Darstellung der Nitrit-Konzentrationen als stabiles Endprodukt von NO im Dialysat (>4 Stunden-dwell) und im Plasma von PD-Patienten im infektfreien Intervall (n=7) und während einer bakteriellen Peritonitis (n=6). Das Konzentrationsverhältnis von Dialysat zum Plasma zeigt eine Signifikanz zwischen beiden Gruppen. Die Werte sind \pm Standardabweichung wiedergegeben.

- **Basale und stimulierte NO Konzentrationen von Peritonealmakrophagen**

PMØ von Patienten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von LPS und IFN- γ beziehungsweise einer Kombination aus beiden im Falle einer Peritonitis in 2 verschiedenen Medien (RPMI nach 24 Stunden Inkubation, PBS zwischen 6-48 Stunden) und im infektfreien Intervall über 24 Stunden aufgrund der geringeren Zellzahlausbeute in PBS inkubiert.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit ließen sich zwar keine signifikanten Nitritkonzentrationen messen. Doch eine Tendenz ließ sich verzeichnen (Abb.4). Eine Steigerung der LPS-Konzentration zeigte eine Steigerung der Nitrit-Konzentration, wobei eine Stimulation mit 1000ng/ml LPS einen maximalen Ertrag erbrachte (1ng/ml LPS: $0.002 \pm 0.003 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, 100ng/ml LPS: $0.008 \pm 0.013 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, 1000 ng/ml LPS: $0.017 \pm 0.036 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.0003 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; nicht signifikant). Eine alleinige Stimulation mit IFN- γ sowie eine Stimulation mehr als 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS inhibierten dagegen die NO-Produktion. In der Gruppe der Kombinationen erbrachten die Stimulationen mit 1ng/ml LPS + 60U/ml IFN- γ und 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ positive, nicht signifikante NO-Erträge ($0.003 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein und $0.017 \pm 0.032 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.0003 \pm 0.002 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; nicht signifikant).

Die NO-Konzentration unstimulierter PM \emptyset zeigte im Falle einer Peritonitis einen 1,6 fachen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Konzentration von infektfreien Kontrollzellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Peritonitis: $0.028 \pm 0.022 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; keine Peritonitis: $0.013 \pm 0.012 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; $p < 0.05$) (Abb.5).

Nach Stimulation mit 1ng/ml LPS und 250U/ml IFN- γ synthetisierten PM \emptyset im Falle einer Peritonitis nur eine geringe zusätzliche Menge an Nitrit nach 24 Stunden Inkubationszeit im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche nicht signifikant war ($0.04 \pm 0.027 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.029 \pm 0.021 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein).

Innerhalb der Peritonitis-Gruppe konnten die bereits per se stimulierten PMØ aus der Peritonealhöhle nach weiterer Stimulation keine signifikanten, jedoch geringfügige Mengen an Nitrit produzieren, welche zahlenmäßig über denen der Kontrollzellen lagen (Abb.6-9). Bei allen 4 Inkubationszeiten erbrachte eine Stimulation mit 1 ng/ml LPS einen Anstieg der Nitrit-Produktion gegenüber den Kontrollzellen (6 Stunden: $0.023 \pm 0.007 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.008 \pm 0.007 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 12 Stunden: $0.037 \pm 0.022 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.026 \pm 0.023 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 24 Stunden: $0.036 \pm 0.028 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.029 \pm 0.027 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; 48 Stunden: $0.033 \pm 0.024 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.031 \pm 0.028 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein; nicht signifikant). In der Gruppe der 6 beziehungsweise 12 Stunden Inkubationszeit erbrachte diese Stimulation gleichzeitig den maximalen Ertrag an Nitrit. In der Gruppe der 24 Stunden Inkubationszeit stieg die Nitritmenge nach Stimulation mit 1 ng/ml LPS +250 U/ml IFN- γ auf ein Maximum von $0.045 \pm 0.03 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.029 \pm 0.027 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, welches nicht signifikant war. Dagegen zeigte eine weitere Stimulation mit 1000 ng/ml LPS nach 48 Stunden ein Maximum von $0.037 \pm 0.034 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0.031 \pm 0.028 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, welches ebenfalls nicht signifikant war.

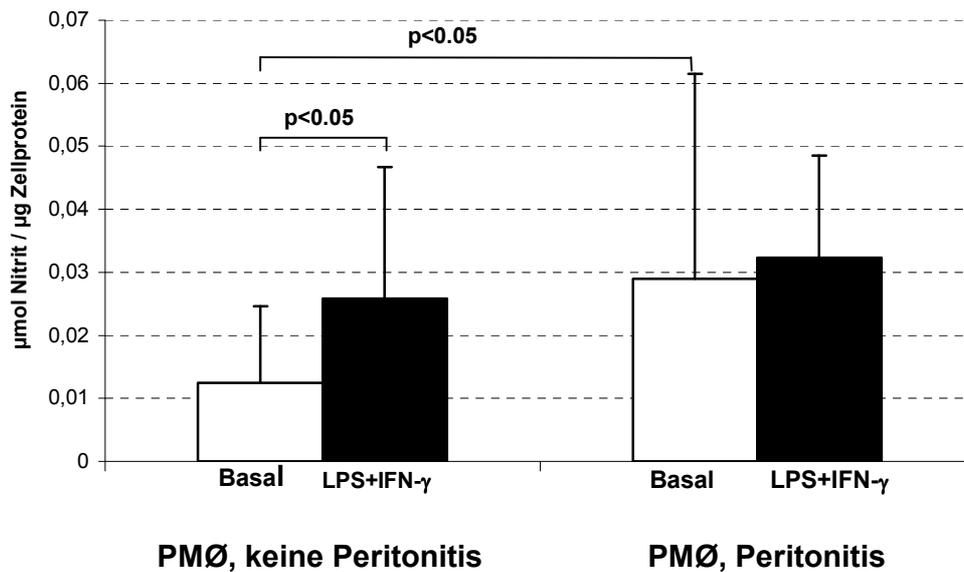


Abbildung 13: Darstellung der NO-Produktion in den Überständen von PMØ, isoliert aus den Effluaten von PD-Patienten, während einer Peritonitis (n=6) und im infektfreien Intervall (n=7). Die Inkubation von jeweils 2×10^6 Zellen erfolgte in PBS und Zusätzen für 24 Stunden. Die Nitrit-Konzentration nicht stimulierter Zellen (Kontrolle) ist der Zellen nach Stimulation mit 1ng/ml LPS+250U/ml IFN- γ gegenübergestellt. Signifikanzen sind mit $p < 0.05$ vermerkt. Die Werte sind \pm Standardabweichung wiedergegeben.

- **Expression der iNOS-mRNA von PMØ**

Es konnte ein positives Signal der iNOS-Expression von PMØ von CAPD-Patienten im Stadium einer bakteriellen Peritonitis nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen, nämlich PMØ im infektfreien Intervall, zeigte sich eine zusätzliche Steigerung (Abb. 22). Es war jedoch eine hohe Amplifikationsrate von 40 Zyklen notwendig, um ein adäquates Ergebnis zu erzielen. Eine weitere Stimulation mit 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ konnte eindeutig eine gesteigerte iNOS-Expression von PMØ

während einer Peritonitis nachweisen. Demgegenüber fehlte aber eine signifikante Steigerung der NO-Produktion wie zuvor bereits erwähnt.

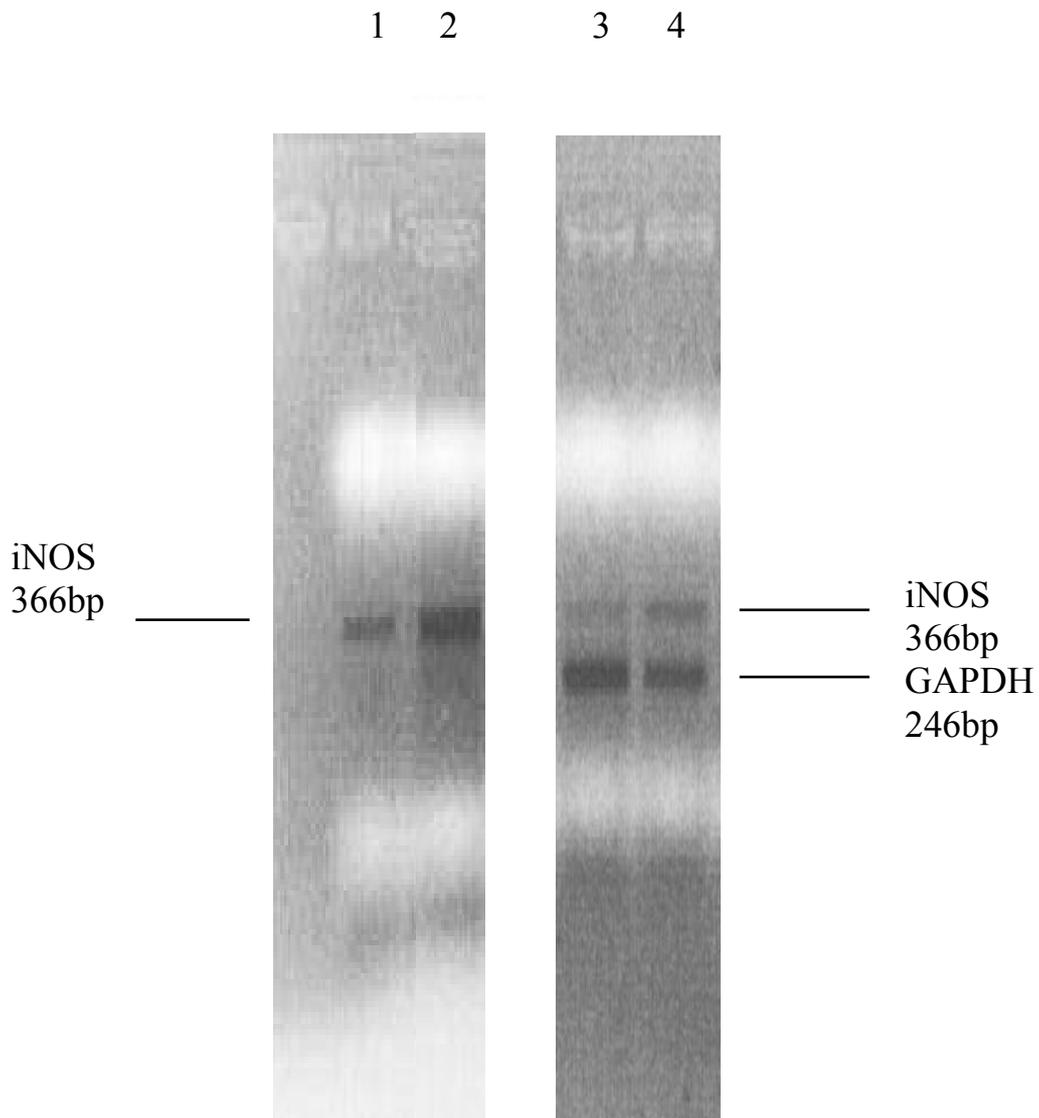


Abbildung 14: Darstellung der iNOS-mRNA Expression in PMØ, isoliert aus dem Peritonealeffluat von einem CAPD-Patienten im Stadium einer akuten Peritonitis. Die Zellen wurden aus dem 4-Stunden dwell Auslaufbeutel (Spalte 1) gewonnen, und die mRNA Expression wurde mittels der RT-Polymerasekettenreaktion erfaßt. Spalte 2 zeigt PMØ (5×10^6) nach zusätzlicher Stimulation mit 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ nach 24 Stunden Inkubation. 5×10^6 HBM wurden in analoger Weise behandelt (Spalte

3: unstimulierte Monozyten; Spalte 4: stimulierte Monozyten mit 1ng/ml LPS + 250 U/ml IFN- γ nach 24 Stunden Inkubation in PBS und Zusätzen).

4. Diskussion:

4.1. Diskussion des methodischen Vorgehens

Wir isolierten PMØ von PD-Patienten in der Frühphase einer bakteriellen Peritonitis. Kontrollzellen waren dabei PMØ von infektfreien PD-Patienten. Zusätzlich wurden periphere Blutmonozyten verwendet, um verschiedene in vitro-Stimulationen in Bezug auf die NO-Freisetzung zu untersuchen.

Die peritoneale Immunabwehr der Peritonealdialysepatienten wird durch ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen Peritonealmakrophagen, Granulozyten und residenten Zellen eingeleitet und gesteuert. Hierbei stellen Peritonealmakrophagen aufgrund ihrer hohen Zellzahl zu Beginn einer akuten Peritonitis die first-line innerhalb der host defense dar. Sie sind zumindest für einen Teil der initialen immunologischen Antwort gegen eingedrungene Erreger in der Peritonealhöhle verantwortlich [110, 111]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich das Peritonealeffluat von gesunden Donoren zu etwa 90 % aus Peritonealmakrophagen, 5-10% Lymphozyten und 5% neutrophilen Granulozyten zusammensetzt [112, 113]. Neben der Phagozytose und Antigenpräsentation sind die Peritonealmakrophagen auch durch Bildung von Immunmediatoren an dem peritonealen Zytokin-Netzwerk beteiligt [111]. Brulez und Verbrugh unterteilen deshalb die immunologische Antwort der Peritonealmakrophagen in 1.: Erkennen, Phagozytose und Abtöten von Mikroorganismen und 2.: Teilnahme an der gesamten immunologischen Antwort [111]. Hierbei erkennen die Peritonealmakrophagen opsonisierte Erreger über spezifische Rezeptoren (z.B. C1- und C3-Rezeptoren), inkorporieren diese per Invagination und töten sie intrazellulär mittels sauerstoffabhängiger und -unabhängiger

Mechanismen ab [111]. Außerdem produzieren die Peritonealmakrophagen im Rahmen des Zytokin-Netzwerkes eine Vielzahl von Immunmediatoren (z.B. IL-1 α und β , IL-6, IL-8, TNF α , TXB₂, PGI₂, PGE₂, LTB₄) und wirken so immunmodulatorisch [110, 111].

Neben vielen Zytokinen wie Interleukin-1 α und 1 β , Interleukin-6, Interleukin-8 scheint auch Stickstoffmonoxid als Mediator eine wesentliche Rolle in diesem Netzwerk einzunehmen. Bereits viele Arbeiten zuvor haben ausführlich die Funktionen von NO beschrieben. Dabei kann NO sowohl physiologische als auch toxische Bedeutung annehmen. An dieser Stelle seien nochmals zusammenfassend die bisher bekannten Funktionen erwähnt:

Relaxation von Blutgefäßen, universeller Botenstoff (z.B. im ZNS: Plastizität von Nervenzellverbindungen), antimikrobielle, antiparasitäre, antineoplastische und antithrombogene Funktion, unspezifische zytotoxische Aktivität von Makrophagen, Triggerung des Zelltodes mittels Apoptose/Nekrose, Produktion hochreaktiver freier Radikale (Peroxynitrit, Hydroxylradikale), direkte Wirkung auf die DNA (z.B. Induktion einer Desaminierung, Strangabbrüche, Mutationen), Leukozytenadhäsion an das Endothel, schließlich als Entzündungsmediator.

Yang *et al.* [85] beschrieben, dass signifikante NO-Konzentrationen im Peritonealdialysat von Peritonealdialysepatienten während einer akuten bakteriellen Peritonitis, welche mit einer gesteigerten Leukozytenzahl zu Beginn einer Peritonitis korrelierten, vorhanden waren.

Zielsetzung dieser vorliegenden Forschungsarbeit war es folglich zu untersuchen, ob aktivierte Peritonealmakrophagen unstimuliert oder nach zusätzlichen makrophagenrelevanten Stimulationen Ursprung der durch die iNOS induzierbaren NO-Produktion sind.

Hierzu wurden PM \emptyset von Peritonealdialysepatienten während einer Peritonitis im akuten Stadium aus Dialysaten wie zuvor beschrieben

isoliert. Die Identifizierung gelang durch die Peroxydase-Färbung. Zunächst mußten jedoch ideale Inkubationszeiten für die folgenden Versuchsreihen gefunden werden. Peritonealmakrophagen infektfreier Peritonealdialyse-Patienten wurden analog isoliert und mittels des MTT-Tests bezüglich ihrer Stoffwechselaktivität untersucht. Als ideal wurde angesehen, wenn mehr als 50% der Ausgangszellen stoffwechselaktiv waren. Es zeigte sich, dass Peritonealmakrophagen bis zu 48 Stunden kultiviert werden können, wobei noch genügend stoffwechselaktive Zellen (>50%) vorhanden waren. Als nächster Schritt wurden sodann systematisch ideale Stimuli untersucht, um möglichst hohe NO-Konzentrationen zu erzielen.

Bekannt ist, dass Peritonealmakrophagen nach Aktivierung mit Zytokinen (IFN- γ) und/oder Bakterienbestandteile (LPS) NO mittels der induzierbaren iNOS produzieren. Bereits andere Autoren erprobten die Wirkung von LPS und IFN- γ als Makrophagen-typische Stimuli hinsichtlich ihrer NO-Freisetzung. In einer ersten Serie von Inkubationsexperimenten wurden sodann Peritonealmakrophagen im Falle einer Peritonitis mit 1ng–10 μ g/ml LPS, 15–1000U/ml IFN- γ sowie verschiedenen Kombinationen (1ng/ml LPS+60U/ml IFN- γ , 1ng/ml LPS+250U/ml IFN- γ , 100ng/ml LPS+60U/ml IFN- γ , 100ng/ml LPS+250U/ml IFN- γ , 100ng/ml LPS+1000U/ml IFN- γ , 10 μ g/ml LPS+15U/ml IFN- γ) aus beiden kultiviert und mittels der Griess-Reaktion auf die freigesetzte NO-Menge hin gemessen.

Zusammenfassend erfolgte die Induktion der NO-Freisetzung sowohl in dosis- als auch in zeitabhängiger Weise. Weiterhin mußte ein geeignetes Medium für die Kultivierung und die NO-Messung eingesetzt werden.

Untersucht wurden 3 Medien:

- RPMI ohne Phenolrot mit Zusätzen
- PBS mit Zusätzen
- Krebspuffer mit Zusätzen.

Es ergaben sich für jedes Medium Vor- und Nachteile. Im Falle des RPMI handelte es sich um ein Medium, das bereits routinemäßig in vorherigen Arbeiten zur Kultivierung von Peritonealmakrophagen eingesetzt wurde. Aufgrund seiner eigenen hohen Nitrit-Kontamination konkurrierte es jedoch mit der NO-Messung mittels der Griess-Reaktion. Diesbezüglich erwiesen sich PBS und KRP als idealer. Der MTT-Test zur Stoffwechselaktivität zeigte, dass im Vergleich zu Krebspuffer in PBS kultivierte Zellen (Peritonealmakrophagen) eine zwar geringere, jedoch höhere Stoffwechselaktivität zeigten. Fortan wurden alle weiteren Versuche dosis- und zeitabhängig in PBS und Zusätzen durchgeführt.

Zur weiteren Klärung der Induktionsmechanismen der NO-Synthese in Peritonealmakrophagen wurden Untersuchungen der induzierbaren iNOS-mRNA Expression durchgeführt.

Als adäquate Referenzzellen wurden einerseits Peritonealmakrophagen von Peritonealdialyse-Patienten im infektfreien Intervall sowie als Vorläuferstufen der Gewebsmakrophagen Blutmonozyten verwendet. Denn nach Goldstein *et al.* besteht ein Großteil der Peritonealmakrophagen aus unreifen Monozyten [112, 113]. In diesem Rahmen ist auch darauf hinzuweisen, dass de Fijter *et al.* in ihrer Studie periphere neutrophile Granulozyten als Kontrollgruppe für Peritonealmakrophagen verwendeten [114].

Die Peritonealmakrophagen infektfreier Peritonealdialyse-Patienten wurden analog zu den infizierten Zellen gewonnen. Die Zellen wurden in PBS und Zusätzen mit 1ng/ml LPS+250 U/ml IFN- γ 24 Stunden inkubiert. Diese Stimulation sowie die Inkubationszeit erwiesen sich in allen

Zellreihen, zum Teil auch signifikant, als starke Stimulationsbedingungen für die NO-Produktion. Der Nachteil dieser nicht infizierten Zellen war jedoch die geringere Zellzahlausbeute ($<100/\mu\text{l}$), welche das infektfreie Stadium kennzeichnet. Eine Ursache für die geringe Zellausbeute besteht darin, dass, sobald die Zellen in Tubes gesammelt und zentrifugiert werden, ein Teil dieser Zellen sich an die Plastikwände der Tubes adhärirt und sich so der Isolation entzieht. Um diesem Verlust entgegenzuwirken, wurde das Effluat in eisgekühlte Tubes aliquotiert und diese schließlich für 30 Minuten bei 2500g und 7C° zentrifugiert. Die Kühlung während der Isolation der Peritonealmakrophagen verhinderte in hohem Maße die Adhäsion der Zellen an der Innenseite der Tubes und erhöhte so die Zellausbeute, die es ermöglichte die Versuchsansätze durchzuführen. Neben der erwünschten Zellzahl gewährte dieses Isolationsverfahren eine ausreichend hohe selektive Gewinnung von Peritonealmakrophagen und eine ausreichende Zellvitalität (93% mononukleäre Zellen, $<5\%$ Trypanblau positiv). Ähnliche Ergebnisse bei vergleichbaren Isolationsverfahren wurden von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [115-117]. Die Blutmonozyten wurden mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation und der anschließenden Adhäsion an eine Plastikoberfläche isoliert. Die alleinige Isolation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wie sie Topley und Jörres *et al.* beschrieben [118, 119] schien unzureichend, da hier polymorphnukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) isoliert werden, und diese aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung den Ansprüchen als Kontrollgruppe für die Peritonealmakrophagen nicht genügten.

Das Isolationsverfahren, das hier zur Anwendung kam, reicherte $85\pm 0,01\%$ Monozyten an bei einer Zellvitalität von weniger als 5% Trypanblau positiver Zellen. Dieses Ergebnis wurde auch von anderen Arbeitsgruppen mit ähnlichen Zahlen bestätigt [115, 120].

Weiterhin wurden die Interleukin-6 und Interleukin-8 Freisetzungen in den Überständen der stimulierten sowie unstimulierten Peritonealmakrophagen im akuten Stadium einer bakteriellen Peritonitis untersucht. Interleukin-6 wird in hohen Konzentrationen im Peritonealeffluat während der Akutphase einer CAPD-assoziierten Peritonitis, nicht aber im entzündungsfreien Intervall, gefunden. Zum anderen gilt dieser Mediator sowohl als pro- als auch anti-entzündlich [89, 90, 103, 104]. Die Induktion der Interleukin-6 Freisetzung erfolgte sowohl dosis- als auch zeitabhängig.

In einem parallelen Ansatz wurde weiterhin die Synthese des Interleukin-8 von Peritonealmakrophagen während einer Peritonitis untersucht. Wie Interleukin-6 wird auch Interleukin-8 in hohen Konzentrationen im Peritonealeffluat infizierter CAPD-Patienten gefunden [89, 90, 103, 104]. Andererseits handelt es sich um eine Substanz mit ausgeprägter chemotaktischer Wirkung, welche auch von Makrophagen/Monozyten synthetisiert wird. Bei der peritonealen Infektabwehr spielt Interleukin-8 eine maßgebliche Rolle bei der chemotaktischen Rekrutierung von Granulozyten. Auch hier wurde die Induktion der Interleukin-8 Freisetzung dosis- und zeitabhängig untersucht.

4.2. Diskussion der patientenbezogenen Daten bei Peritonitis

- **NO Freisetzung**

In dieser Arbeit konnte eine höhere NO-Produktion im Peritonealdialysat von Patienten während einer bakteriellen Peritonitis im Vergleich zu infektfreien Effluaten von PD-Patienten nachgewiesen werden. Dabei korrelierte die Höhe der NO-Konzentration im Dialysat mit der akuten Phase der Peritonitis. Ein erhöhtes Dialysat/Plasma NO-Verhältnis (>1)

war beschreibend für eine lokale peritoneale NO-Produktion im Falle einer Inflammation. Nitrit kann leicht mit dem Blut mittels des Peritoneums equilibrieren. Dies kann durch den vasodilatierenden Effekt von NO gesteigert werden. Somit wurden in dieser Arbeit nicht hohe NO-Konzentrationen im Effluat erwartet, vielmehr war der Wechsel im Verhältnis von Dialysat zu Plasma ausschlaggebend.

PMØ von Peritonitis-Patienten zeigten eine signifikant höhere NO-Freisetzung nach einer Inkubationsreihe von 6 bis 48 Stunden in PBS und Zusätzen im Vergleich zu infektfreien Kontrollen. Darüber hinaus gelang es, eine mäßige, jedoch eindeutig induzierbare Erhöhung der NO-Freisetzung in Peritonealmakrophagen und humanen Blutmonozyten unter denselben Stimulationsbedingungen mit LPS und IFN- γ zu messen, welche von der iNOS-Aktivität abhängig war. Eine erhöhte iNOS mRNA-Expression von PMØ während einer Peritonitis mittels RT-PCR konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Außerdem konnten verschiedene Kalzium-Konzentrationen im Inkubationspuffer keine Veränderung der NO-Konzentrationen erzielen. Aber im Vergleich zu den hohen NO-Konzentrationen, welche von Maus- oder Ratten-Peritonealmakrophagen beschrieben werden, liegen unsere Werte deutlich darunter.

Während Monozyten und Peritonealmakrophagen im infektfreien Intervall signifikante NO-Mengen nach der Stimulation mit 1ng/ml LPS+250U/ml IFN- γ nach 24 Stunden aufwiesen, konnte eine Signifikanz im Falle der infizierten Zellen nicht gefunden werden. Ein möglicher Grund einer fehlenden Signifikanz im Falle einer Peritonitis bei den PMØ durch zusätzliche Stimulation mit LPS oder IFN- γ könnte die Tatsache sein, dass bereits die Peritonealmakrophagen durch den intraperitonealen Infekt per se aktiviert sind und zu einer weiteren gesteigerten NO-Freisetzung nicht in der Lage sind. Vielmehr könnte es sein, dass diese bereits aktivierten Zellen eine Erholungsphase benötigen, um zum gegebenen Zeitpunkt

erneut NO freizusetzen. Denn es zeigten sich mengenmäßig bei allen drei Zellen (PMØ infektfreier und infizierter PD-Patienten sowie Blutmonozyten) ähnliche NO-Konzentrationsmengen (0.042-0.046µmol/µg Zellprotein) entsprechend der Stimulationen. Außerdem fanden sich im Falle der PMØ infizierter Peritonealdialysepatienten und Monozyten ähnliche Konzentrationsmengen nach den folgenden Stimulationen 1ng/ml LPS, 100ng/ml LPS, 1ng/ml LPS+60U IFN-γ und 1ng/ml LPS+250U IFN-γ. Diese betragen für 6 Stunden Inkubationszeit 0.016-0.029µmol Nitrit/µg Zellprotein, für 12 Stunden 0.025-0.042µmol Nitrit/µg Zellprotein, für 24 Stunden 0.028-0.046µmol Nitrit/µg Zellprotein und schließlich für 48 Stunden 0.025-0.037µmol Nitrit/µg Zellprotein. Im Falle der Monozyten waren diese außerdem signifikant.

- **Zytokinfreisetzung**

In den durchgeführten Inkubationsexperimenten zeigte sich, dass die bereits durch die Peritonitis aktivierten Peritonealmakrophagen bei fast denselben Stimulationsbedingungen sowohl signifikante Konzentrationen an Interleukin-6 als auch Interleukin-8 synthetisieren, außer nach der Stimulation mit 1ng/ml LPS+250U/ml IFN-γ im Falle der Interleukin-8 Messreihe. In beiden Versuchen zeigte es sich, dass eine Inkubation nach 48 Stunden die Konzentrationen von IL-6 und IL-8 signifikant gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen steigerte, wobei sich außerdem zeigte, dass die IL-6 und 8 Werte der 48 Stunden >der 24 Stunden >der 12 Stunden >der 6 Stunden lagen. Im Falle der Interleukin-8 Freisetzung konnte in manchen Fällen sogar bis zu einer Verdreifachung der Konzentration im Vergleich zu den unstimulierten Zellen festgestellt werden. Dabei war die von Peritonealmakrophagen freigesetzte Menge an IL-6 und IL-8 nach entsprechender Stimulation mit LPS/INF-γ vergleichbar

mit den bereits vorliegenden publizierten Konzentrationen (für IL-6 um 50pg/ μ g Zellprotein und IL-8 50-100pg/ μ g Zellprotein). Die dafür erforderlichen Stimulationsdosen lagen dabei in einer Größenordnung (für INF- γ 50-250ng/ml und LPS 1-100ng/ml), die im Peritonealdialysat infizierter PD-Patienten gefunden wird und somit biologisch relevant sein dürfte.

4.3. Ergebnisse im aktuellen wissenschaftlichen Umfeld

Das NO-System gilt als essentieller Bestandteil antimikrobieller sowie antineoplastischer Aktivitäten von Zytokin produzierenden Zellen einschließlich von Makrophagen [102]. In dieser Arbeit fanden wir erhöhte NO-Produktionen im Peritonealdialysat von PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis im Vergleich zum infektfreien Intervall. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Yang *et al.* [85] berichtet. Dabei korrelierten hohe NO-Konzentrationen im Effluat mit einer hohen Leukozytenzahl im Dialysat während einer akuten Phase einer bakteriellen Peritonitis. Ein gesteigertes Verhältnis von D/P an NO (>1) war ein Indiz für eine lokale intraperitoneale NO-Produktion im Falle einer Infektion. Nitrit, welches ein kleines Molekül und lipophil ist, kann leicht mittels der Durchblutung in die Peritonealhöhle diffundieren. Dieses Ereignis kann außerdem durch die vasodilatierende Wirkung des NO begünstigt werden. Somit kann eine hohe NO-Konzentration im Dialysat zwar nicht erwartet werden, jedoch eine Umkehr des D/P Verhältnisses.

In der Akutphase einer Peritonitis kann eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ und TNF im Dialysat von PD-Patienten gemessen werden. Sowohl Makrophagen als auch residente Peritonealzellen tragen zu dieser Produktion bei [44, 89-90, 103-104]. Bakterielle Lipopolysaccharide und Zytokine, vor allem aber IL-

1 und IFN- γ , sind als starke iNOS Aktivatoren bekannt. Inwieweit jedoch humane Peritonealmakrophagen zur Produktion von NO befähigt sind, wird immer noch kontrovers behandelt.

Wir isolierten PM \emptyset von PD-Patienten im akuten Stadium einer bakteriellen Peritonitis und führten Untersuchungen an Zellen im infektfreien Intervall als Kontrolle durch. Außerdem wurden HBM als Vorläuferzellen von PM \emptyset anhand verschiedener Stimulationen *in vitro* bezüglich ihrer NO-Produktion untersucht. PM \emptyset , welche von Patienten mit einer Peritonitis isoliert wurden, zeigten eine erhöhte NO-Freisetzung nach einer Inkubationszeit von 6-48 Stunden in PBS und Zusätzen im Vergleich zu infektfreien Kontrollzellen. Wir fanden zwar eine mäßige, jedoch eindeutig signifikante induzierbare Steigerung der NO-Freisetzung von PM \emptyset infektfreier Patienten und von HBM nach einer Stimulation mit LPS und IFN- γ . Die NO-Freisetzung war in erster Linie abhängig von der iNOS-Aktivität. Wir konnten eine gesteigerte iNOS mRNA Expression in PM \emptyset bei Patienten mit einer Peritonitis mittels des RT-PCR nachweisen. Verglichen zu den hohen NO-Konzentrationen, die im Mäuse- bzw. Ratten-Modell beobachtet werden [35], sind unsere Werte eher gering. Obwohl einige Autoren eine NO-Produktion in menschlichen Peritonealmakrophagen und Blutmonozyten nicht verzeichnen konnten [91,105-106], beobachteten andere wiederum eine Induktion der NO-Freisetzung oder eine iNOS-Expression [84,107-109].

Bezogen auf unsere Ergebnisse übernehmen PM \emptyset die NO-Freisetzung im Falle einer Peritonitis. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch andere residente Zellen, welche in der Peritonealhöhle nachzuweisen sind, dazu beitragen, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten oder Mesothelzellen. In Endothelzellen fand man als erste Zellart den Nachweis der NO-Produktion, die NO klassischerweise mittels der c-NOS produzieren. Monozyten sezernieren NO mittels der i-NOS. Neuerdings

konnten Chen *et al.* [99] belegen, dass auch Mesothelzellen zur NO-Produktion fähig sind.

4.4. Schlussfolgerung

Klinisch gesehen bleibt es eine schwierige Frage, ob die peritoneale Freisetzung von NO und entsprechenden Radikalen (z.B. Peroxynitrit, formiert durch eine Reaktion mit Superoxid) als essentieller Faktor in der peritonealen Host defence (gegen Protozoen, Bakterien) wirkt oder ob NO das Risiko einer ernsthaften Zerstörung der Peritonealmembranstruktur (Verlust der Permeabilität, Apoptose, Zellstrukturschädigung) in sich birgt [121].

Aus technischer Sicht ist die Nitrit-Messung von NO eine leichte Methode, um eine peritoneale Inflammation zu erfassen. Infolge seiner kleinen Molekulargröße kann Nitrit leicht aus dem Peritoneum in die Blutzirkulation diffundieren. Andererseits hängt die Nitrit-Konzentration im Dialysat und im Blutplasma von der Nahrungsaufnahme in Form von Nitratsalzen ab. Aus diesem Grunde ist nicht der absolute Nitritgehalt, sondern das Verhältnis von Dialysat zum Plasma der entscheidende adäquate Indikator für eine intraperitoneale NO-Freisetzung zu sehen.

Bezüglich der kritischen Betrachtung der verwendeten Methoden sollte in erster Linie auf die generellen Limitationen von *in vitro*-Modellen im Vergleich zum Gesamtorganismus hingewiesen werden. Die verwendete Zellisolierung geht zwangsläufig mit einer Selektion der widerstandsfähigeren Zellen einher, die keineswegs repräsentativ für die generellen Verhältnisse in der Peritonealhöhle gelten muß. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass in dieser vorliegenden Forschungsarbeit Peritonealmakrophagen aus einem komplexen Zytokin-produzierenden Netzwerk, in dem auch andere Zellreihen wie Mesothelzellen und Fibroblasten gemeinschaftlich fungieren, isoliert werden und separat auf ihre weitere Nitritproduktion in einem *in vitro*-Modell untersucht werden.

Weiterhin sollte man die analytischen Techniken kritisch untersuchen: die Polymerasekettenreaktion, die eine allenfalls semiquantitative Technik wiedergibt. Darüber hinaus erfasst die PCR lediglich eine steady-state mRNA-Expression. Dies bedeutet, dass, wenn sich eine Steigerung nach Stimulation zeigt, dies nicht zwangsläufig auf eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität hinweisend ist. Es muß aber auch vermerkt werden, dass eine erhöhte mRNA-Expression eines Proteins nicht unbedingt mit einer gesteigerten Proteinsynthese verknüpft ist.

Nicht zu vergessen ist, dass die Nitritbestimmung mittels der Griess-Reaktion eine Sensitivität im Mikromol-Bereich aufweist. Somit können Konzentrationen im Nanomol-Bereich nicht mit ausreichender Empfindlichkeit bestimmt werden.

5. Zusammenfassung

NO wird von verschiedenen Zelltypen produziert und sezerniert. Es ist ein wichtiger Mediator in vielen biologischen Prozessen einschließlich der von Makrophagen vermittelten zellulären Host defense. Die Relevanz und die Menge der NO-Produktion im Peritonealdialysat während einer bakteriellen Peritonitis ist noch nicht vollständig geklärt.

Wir untersuchten in dieser Arbeit, ob humane Peritonealmakrophagen, welche von Peritonealdialysepatienten im infektfreien Intervall und während einer bakteriellen Peritonitis isoliert wurden, eine spontane oder eine durch LPS/ IFN- γ induzierte NO-Produktion aufwiesen. Die Ergebnisse wurden sodann mit dem Verhalten von humanen Blutmonozyten als Vorläuferzellen der Gewebemakrophagen verglichen.

Außerdem wurden die NO-Konzentrationen von Blutplasma und Peritonealeffluat in vivo gemessen.

Peritonealmakrophagen wurden aus dem Effluat von CAPD Patienten in der Frühphase einer bakteriellen Peritonitis ($3-6 \times 10^3$ Leukozyten/ μ l Dialysat) einerseits und andererseits im infektfreien Intervall als Referenzgruppe ($0.5-2 \times 10^2$ Leukozyten/ μ l Dialysat) gewonnen. $2-3 \times 10^6$ Zellen wurden für 24 Stunden mit 1ng LPS + 250U IFN- γ /ml in PBS und Zusätzen (10% FCS, 1% Glutamin, 1% Glucose). Die Nitritmenge wurde in den Überständen der Proben mittels der Griess-Reaktion ermittelt.

Peritonealmakrophagen von Patienten mit einer Peritonitis zeigten eine größere NO-Produktion vergleichsweise zu den Zellen von gesunden Spendern ($0,038 \pm 0,045$ μ mol/ μ g Zellprotein versus $0,015 \pm 0,015$ μ mol/ μ g Zellprotein, $p < 0.05$). Es konnte jedoch keine weitere relevante NO-Produktion durch eine zusätzliche Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen beziehungsweise Kombinationen von LPS/IFN- γ erzielt werden. Dagegen produzierten Peritonealmakrophagen im infektfreien

Intervall signifikante NO Mengen nach Inkubation mit LPS/IFN- γ ($0,045 \pm 0,031 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0,015 \pm 0,015 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein $p < 0,01$). Blutmonozyten setzten ebenfalls signifikant erhöhte NO-Mengen unter denselben Voraussetzungen frei ($0,075 \pm 0,031 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0,031 \pm 0,004 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, $p < 0,05$). Darüber hinaus produzieren in vitro-Peritonealmakrophagen im Falle einer Peritonitis bereits höhere und signifikante NO-Mengen als solche im infektfreien Intervall ($0,028 \pm 0,026 \mu\text{mol Nitrit}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0,013 \pm 0,01 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Zellprotein, $p < 0,05$). Außerdem produzieren Peritonealmakrophagen im infektfreien Intervall nach Stimulation signifikant NO-Mengen, die zahlenmäßig nahe den der o.g. Produktion liegen ($0,026 \pm 0,02 \mu\text{mol Nitrit}/\mu\text{g}$ Zellprotein versus $0,013 \pm 0,01 \mu\text{mol Nitrit}/\mu\text{g}$ Zellprotein, $p < 0,05$).

In vivo wiesen Patienten während einer Peritonitis ein höheres Dialysat/Plasma-Verhältnis an NO im Vergleich zu den Kontrollzellen auf (Peritonitis: D/P=1.3, infektfreies Intervall: D/P=0.4, $p < 0,05$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Peritonealmakrophagen signifikante NO Mengen während einer bakteriellen Peritonitis freisetzen. Die Reaktion kann durch eine Inkubation mit LPS/IFN- γ in vitro induziert werden, was wiederum eine stimulierbare iNOS Aktivität anzeigt. Die Daten am Modell der menschlichen Peritonitis unterstreichen eine potentielle therapeutische Relevanz in der Modulation der iNOS-Aktivität.

6. Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

AQP-1	Aquaporin-1
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPD	Continuous ambulatory peritoneal dialysis
CCPD	Continuous cyclic peritoneal dialysis
cNOS	Konstitutive Nitritoxidsynthase
CSF	Colony stimulating factor
CSU	Colony stimulating unit
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
HD	Hämodialyse
HBM	Humane Blutmonozyten
HPFM	Humane peritoneale Fibroblasten
HPMC	Humane peritoneale Mesothelzellen
HUVEC	Humane Umbilikal-Venen-Endothelzelle
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-3	Interleukin-3
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
iNOS	induzierbare Nitritoxidsynthase
KRP	Krebspuffer

LMA	N-Monomethyl-L-Arginin
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin Methylester
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NIPD	Nächtlich intermittierende Peritonealdialyse
NO	Stickstoffmonoxid (``nitric oxide``)
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
PBS	Phosphate buffered saline
RT-PCR	Reverse transkriptase Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
6-keto-PGF _{1α}	6-keto-Prostaglandin F _{1α}
PGI ₂	Prostazyklin
PD	Peritonealdialyse
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
PMØ	Peritonealmakrophagen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor

7. Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des intraperitonealen Zytokin-Netzwerkes aus Mikroorganismen, Peritonealmakrophagen, Mesothelzellen und Fibroblasten.....12

Abbildung 2: Identifikation von Peritonealmakrophagen mittels der Peroxidase-Färbung, modifiziert nach Kaplow. Peritonealmakrophagen erscheinen dunkelrot und können so von anderen Zellen unterschieden werden.....35

Abbildung 3: Darstellung des MTT- Tests zur Vitalitätsbestimmung von PMØ (n=6) in PBS bzw. KRP und Zusätzen nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit.* bedeutet Signifikanz gegenüber der Kontrolle in PBS, die auf 100% gesetzt wurde; ** bedeutet Signifikanz gegenüber der Kontrolle in KRP; p<0.05.43

Abbildung 4: Darstellung des MTT-Tests zur Vitalitätsbestimmung von HBM (n=6) in PBS bzw. KRP und Zusätzen nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation. * bedeutet Signifikanz gegenüber Kontrollzellen in PBS, die auf 100% gesetzt wurden, ** bedeuten Signifikanz gegenüber Kontrollzellen in KRP inkubiert; p<0.05.....44

Abbildung 5: Darstellung der NO-Produktion in den Überständen von PMØ, isoliert aus den Effluaten von PD-Patienten, während einer Peritonitis (n=6) und im infektfreien Intervall (n=7). Die Inkubation von jeweils 2×10^6 Zellen erfolgte in PBS und Zusätzen für 24 Stunden. Die NO-Konzentration nichtstimulierter Zellen (Kontrolle) ist der der Zellen nach Stimulation mit 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ gegenübergestellt. Signifikanzen gegenüber nichtstimulierten Zellen sind mit p<0.05 vermerkt.....47

Abbildung 6: Darstellung der NO-Produktion von den Überständen der PMØ, isoliert aus den Effluaten n=6 PD-Patienten, während einer bakteriellen Peritonitis nach Stimulation mit LPS (1ng–10 μ g/ml), IFN- γ (15U–1000U/ml) und verschiedenen Kombinationen aus beiden. Die Inkubationszeit beträgt 24 Stunden in RPMI und Zusätzen. Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen kultiviert.....48

Abbildung 7: Darstellung der NO-Konzentration in den Überständen von HBM als Vorläuferzellen von PMØ, isoliert aus n=6 Buffy coats. Die Inkubation erfolgte in PBS und Zusätzen für 6 und 12 Stunden (I-II). Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, p<0.05.....50

Abbildung 8: Gegenüberstellung der NO-Freisetzung von PMØ (I), isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis und HBM (II), isoliert aus n=6 Buffy coats, in einem Zeitdiagramm (6-48 Stunden Inkubationszeit). Die Inkubation fand in PBS mit Zusätzen statt. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U– 1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt* bedeutet Signifikanz gegenüber nicht-stimulierten Kontrollzellen; p<0.05.....51

Abbildung 9: Darstellung der IL-6-Freisetzung von PMØ, isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis. Die Freisetzung wurde nach 6 und 12 Stunden Inkubation (I-II) in PBS gemessen. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng– 10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/m) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, p<0.05.....53

Abbildung 10: Darstellung der IL-8-Freisetzung von PMØ, isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten, während einer bakteriellen Peritonitis. Die Freisetzung wurde nach 6 und 12 Stunden Inkubation (I-II) in PBS gemessen. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als Stimulantien eingesetzt. Aufgeführt sind Signifikanzen gegenüber den Kontrollzellen, p<0.05.....55

Abbildung 11: Gegenüberstellung der Interleukin-6 (I) und Interleukin-8 Freisetzung (II) von PMØ, isoliert aus den Effluaten von n=6 PD-Patienten während einer bakteriellen Peritonitis in einem Zeitdiagramm (6-48 Stunden Inkubationszeit). Die Inkubation fand in PBS mit Zusätzen statt. Es wurden verschiedene Konzentrationen aus LPS (1ng–10µg/ml), IFN-γ (15U–1000U/ml) und Kombinationen aus beiden als

Stimulantien eingesetzt. * bedeutet Signifikanz gegenüber nicht stimulierten Kontrollzellen; $p < 0.05$56

Abbildung 12: Darstellung der-Nitrit-Konzentrationen als stabiles Endprodukt von NO im Dialysat (>4 Stunden-dwell) und im Plasma von PD-Patienten im infektfreien Intervall (n=7) und während einer bakteriellen Peritonitis (n=6). Das Konzentrationsverhältnis von Dialysat zum Plasma zeigt eine Signifikanz zwischen beiden Gruppen.....58

Abbildung 13: Darstellung der NO-Produktion in den Überständen von PMØ, isoliert aus den Effluaten von PD-Patienten, während einer Peritonitis (n=6) und im infektfreien Intervall (n=7). Die Inkubation von jeweils 2×10^6 Zellen erfolgte in PBS und Zusätzen für 24 Stunden. Die Nitrit-Konzentration nichtstimulierter Zellen (Kontrolle) ist der der Zellen nach Stimulation mit 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ gegenübergestellt. Signifikanzen sind mit $p < 0.05$ vermerkt.....61

Abbildung 14: Darstellung der iNOS-mRNA Expression in PMØ, isoliert aus dem Peritonealeffluat von einem CAPD-Patienten im Stadium einer akuten Peritonitis. Die Zellen wurden aus dem 4-Stunden dwell Auslaufbeutel (Spalte 1) gewonnen, und die mRNA Expression wurde mittels der RT-Polymerasekettenreaktion erfaßt. Spalte 2 zeigt PMØ (5×10^6) nach zusätzlicher Stimulation mit 1ng/ml LPS + 250U/ml IFN- γ nach 24 Stunden Inkubation. 5×10^6 HBM wurden in analoger Weise behandelt (Spalte 3: unstimulierte Monozyten; Spalte 4: stimulierte Monozyten mit 1ng/ml LPS + 250 U/ml IFN- γ nach 24 Stunden Inkubation in PBS und Zusätzen).....62

Tabelle 1: Klinische Daten der untesuchten CAPD-Patienten30

8. Literaturverzeichnis

1. DI PAOLO N, SACCHI G: Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. *Contrib Nephrol* 84:10-26,1990
2. DOBBIE JW: Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif* 7:74-85, 1989
3. WEGENER, WOLLHEIM E: Diskussionsbemerkung. *Verh dtsch Ges inn Med.* 6:770, 1877
4. STARLING EH, TUBBY AH: An absorbtion from and secretion into the serous cavities. *J. Physiol (London)* 16: 140, 1894
5. ORLOW WN: Einige Versuche über die Resorption in der Bauchhöhle.
J. Physiol (London) 16: 140, 1895
6. PUTNAM T: The living peritoneum as a dialyzing membrane. *Amer. J. of Physiol* 63: 548, 1922
7. GANTER G: Über die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blut durch Dialyse. *Münch Med Wochenschrift* 70:1478, 1923
8. BALASZ J, ROSENAK S: Zur Behandlung der Sublimatanurie durch peritoneale Dialyse. *Wien klinische Wschr* 47:851, 1934

9. GROLLMAN A, TURNER LB, McLEAN JA: Intermittent peritoneal lavage in nephrectomized dogs and its application to the human being. *Arch intern Med* 87:379, 1951
10. WESTON RE, ROBERTS M: Clinical use of stylet-catheter for peritoneal dialysis. *Arch intern Med* 115:659, 1965
11. TENCKHOFF H, SCHECHTER H: A bacteriologically safe access device for repeated peritoneal dialysis. *Trans Amer Soc Artif Intern Organs* 14: 181, 1968
12. OREOPOULOS DG, ROBSON M, IZATT S, CLAYTON D, DE VEBER GA: A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Trans Amer Soc Artif Intern Organs* 24:484, 1978
13. MONCRIEF JW, Guest Interview: Dr. Jack Moncrief. *Contemporaray Dialysis* 2:16, 1981
14. COLOMBI S: Kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse CAPD und verwandte Verfahren. *F. Enke Verlag Stuttgart*, 1996
15. GRABENSEE B: Checkliste Nephrologie. *Thieme Verlag*, 2000
16. PLUM J, ARTIK S, BUSCH T, SAHIN K, GRABENSEE B: Oral versus intraperitoneal application of clindamycin in tunnel: A prospective, randomized study in CAPD patients *Peri Dial Inter*, 1997

17. DOBBIE JW: Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 12:14-27, 1992
18. BRUNNER FP, EHRLICH JHH, FASSBINDER W, GEERLINGS W: Combined report on regular dialysis and transplantation in Europe. *Nephrol Dial Transplant* 6:21-25, 1991
19. FIJEN JW, STRUIJK DG, KREDIET R, BOESCHOTEN EW, deVRIES JP, ARISZ L: Dialysate leucocytosis in CAPD patients without clinical infection. *Neth J Med* 33: 270-80, 1988
20. TOPLEY N: The host's initial response to peritoneal infection: The pivotal role of the mesothelial cell *Perit Dial Int* Vol. 15, pp 116-117, 1993
21. TOPLEY N: The cytokine network controlling peritoneal inflammation. *Perit Dial Int* Vol. 15 No. 7 (Suppl), 1995
22. JÖRRES A: Untersuchungen zur Rolle der Fibroblasten bei der peritonealen Infektabwehr, Habilitationsschrift
23. JOHNSTON RB, ZUCKER-FRANKLIN D: The mononuclear phagocyte system. *In: Atlas of blood cells: function and synthesis*, 1988
24. TOPLEY N: The cytokine network controlling peritoneal inflammation. *Perit Dial Int* Vol. 15, No. 7 (Suppl), 1995

25. KRANE SM, GOLDRING MB: Potential role for interleukin-1 in fibrosis associated with chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Blood Purif* 6:173-177,1988
26. MATSUSHIMA K, OPPENHEIM JJ: Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine* 1:2-13. 1989
27. TOPLEY N: The host's initial response to peritoneal infection: The pivotal role of the mesothelial cell, *Perit Dial Int*, Vol. 15: 116-117, 1995
28. DOUVDEVANI A, RAPOPORT A, KONFORTY A et al.: Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 α and β . *Kidney Int* 46: 993-1001, 1994.
29. TOPLEY N, PETERSEN MM, MACKENZIE R et al.: Human peritoneal mesothelial cell prostaglandin synthesis: induction of cyclooxygenase mRNA by peritoneal macrophage derived cytokines. *Kidney Int* 46: 900-909, 1994
30. TOPLEY N, BROWN Z, JÖRRES A et al.: Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-8: synergistic induction by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Am J Pathol* 1993; 142: 1876-86.
31. BETJES MGH, TUK CW, STRUIJK DG, KREDIET RT, ARISZ L, HART M, BEELEN RHJ: Interleukin-8 Production by human peritoneal mesothelial cells in response to Tumor necrosis factor- α ,

- Interleukin-1, and medium conditioned by macrophages cocultured with *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases* 168: 1202-10, 1993
32. STEINHAUER HB, GÜNTER B, SCHOLLMAYER P: Stimulation of peritoneal synthesis of vasoactive prostaglandins during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *European Journal of Clinical Investigation* 15: 1-5, 1985
 33. IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery vein is nitric oxide *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269, 1987
 34. IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery vein is nitric oxide *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269, 1987
 35. MONCADA S, HIGGS A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 329:2002, 1993
 36. CHO HJ, XIE QW, CALACAY J, NATHAN C: Calmodullin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages *J Exp Med* 176: 599-604, 1992
 37. KNOWLES RG, PALACOIS M, FEDERICI C: formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5159-5162, 1989

38. BUSSE R, MÜLSCH A: Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin *FEBS Letters* 265: 133-136, 1990
39. STRUEHR DJ, MARLETTA MA: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon- τ *J Immunol* 139: 518-526, 1987
40. DRAPIER JC, WIETZERBIN J, HIBBS JB Jr.: Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages *Eur J Immunol* 18: 1587-1592, 1988
41. HEVEL JM, WHITE KA, MARLETTA MA: Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein *J Biol Chem* 266: 22789-22791, 1991
42. YUI Y, HATTORI R, KOSUGA K: Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils *J Biol Chem* 266: 3369-3371, 1991
43. STAMLER JS, SINGEL DJ, LOSCALZO J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms *Science* 258: 1898-1902, 1992
44. DINERMAN JL, LÖWENSTEIN CJ, SYNDER SH: molecular mechanism of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease *Circ Res* 73: 217-222, 1993

45. LANGREHR JM, HOFFMANN RA, LANCASTER JR Jr: Nitric oxide: A new endogenous immunomodulator *Transplantation* 55: 1205-1212, 1993
46. DAWSON TM, DAWSON VL, SYNDER SH: A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide *Ann Neurol* 32: 297-311, 1992
47. STRUEHR DJ, NATHAN CF: Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytotoxicity and respiratory inhibition in tumor target cells *J Exp Med* 169: 1543-1555, 1989
48. HIBBS J Jr., TAINTOR RR, VAVRIN Z: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule *Biochem Biophys Res Commun* 157: 87-94, 1988
49. KIRK SJ, REGAN MC, BARBUL A: Cloned murine T-Lymphocytes synthesize a molecule with the characteristics of nitric oxide *Biochem Biophys Res Commun* 173: 660-665, 1990
50. SCHMIDT HW, SEIFERT R, BOEHME E: Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by chemotactic peptide, platelet activating factor and leucotriene B4 *FEBS Lett* 244: 357-360, 1989
51. KNOWLES RG, PALACIOS M, FEDERICI C: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system. A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5159-5162, 1989

52. WERNER-FELDMAYER G, WERNER ER, FUCHS D: Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts *J Exp Med* 172: 1599-1607, 1990
53. CURRAN R, BILLIAR T, STRUEHR DJ: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine response to inflammatory products of Kupffer cells *J Exp Med* 170: 1769-1778, 1989
54. STADLER J, STEFANOVICH RM, BILLIAR TR: Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide *J Immunol* 147: 3915-3920, 1991
55. AMBER IJ, HIBBS JB, TAINTOR RR: Cytokines induce L-arginine dependent effector system in non-macrophage cells *J Leuk Biol* 44: 58-67, 1988
56. KOLB-BACHHOFEN V, FEHSEL K, MICHEL G, RUZICKA T: Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris *Lancet* 344: 139, 1994
57. HIBBS J Jr.: Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumor and antimicrobial activity. *Res Immunol* 142:565, 1991
58. GRYGLEWSKI RJ, PALMER RMJ, MONCADA S: Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor *Nature* 320: 454-456, 1986

59. COCKS TM, ANGUS JA, CAMPELL GR: Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (ERDF) from endothelial cells in culture *J Cell Physiol* 123: 310-320, 1985
60. HEINZEL B, JOHN M, KLATT P: Calcium-calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase *Biochem J* 281: 627-633, 1992
61. POU S, POU WS, BREDT DS: Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase *J Biol Chem* 267: 24173-24178, 1992
62. LIEW FY, COX FEG.: Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide *Immunol Today* 12: A17-A21, 1991
63. NATHAN CF, HIBBS JB Jr.: role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity *Curr Opin Immunol* 3: 65-70, 1991
64. NATHAN C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051, 1992
65. COCKS TM, ANGUS JA, CAMPELL GR: Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (ERDF) from endothelial cells in culture *J Cell Physiol* 123: 310-320, 1985
66. GRANGER DL, PERFECT JR, DURACK DT: Macrophage-mediated fungistasis invitro: requirements for intracellular cytotoxicity *J Immunol* 136: 672-680, 1986
67. ADAMS LB, HIBBS JB Jr., TRANTOR RR: Microbiostatic effect of murine activated macrophages for toxoplasma gondii. Role for synthesis

- of inorganic nitrogen oxides from L-arginine *J Immunol* 144: 2725-2729, 1990
68. GREEN SJ, MELTZER MS, HIBBS JB Jr.: Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism *J Immunol* 144: 278-283, 1990
 69. JAMES S, Claven J: Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves L-arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates *J Immunol* 143: 4208-4215, 1989
 70. CROEN KD: Evidence for an antiviral effect of nitrite oxide: Inhibition of Herpes Simplex virus type-1 replication *J Clin Invest* 91: 2446-2452, 1993
 71. COOK HT, SULLIVAN R: Glomerular nitrite synthesis in situ immune complex glomerulonephritis in the rat *Am J Pathol* 139: 1047-1052, 1991
 72. KOLB H, KOLB-BACHHOFEN V: Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity *Immunol Today* 13: 157-161, 1992
 73. McCARTNEY-FRANCIS N, ALLEN JB, MIZEL DE, NATHAN CF: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase *J Exp Med* 178: 749-754, 1993
 74. LANCASTER JR, SWEETLAND MA, CLARK A, HIBBS JB: Involvement of NO and subsequent iron-nitrosyl formation in cellular

dysfunction induced by cytotoxic macrophages *J Cell Biochem Suppl* 14 (B): 109 A (Abstract), 1990

75. DRAPIER JC, HIBBS JB: Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur wnzymes in the macrophage effector cells *J Immunol* 140: 2829-2836, 1988
76. ARROYO PL, HATCH-PIGOTT V, MOWER HF, COONEY RV: Mutagenicity of nitric oxide and its inhibition by antioxidants *Mutation Res* 281: 193-202, 1992
77. FEHSEL K, JALOWY A, QI S, KOLB H: Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide *Diabetes* 42: 496-500, 1993
78. FÖRSTERMANN U, KLEINERT H: Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Arch Pharmacol* 352:351-364, 1995
79. DASGUPTA MK, LARABIE M , HALLORAN PF: Interferon-gamma levels in peritoneal dialysis effluents: relation to peritonitis *Kidney Int* 46:475-481, 19942
80. CHARLES IG, PALMER RMJ, HICKERY MS, BAYLISS MT, CHUBB AP, HALL VS et al.: Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11419, 1993

81. NUSSLER AK, DI SILVIO M, BILLIAR TR, HOFFMAN RA, GELLER DA, SELBY R et al.: Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 176:261, 1992
82. PALMER RM, HICKERY MS, CHARLES IG, MONCADA S, BAYLISS MT: Introduction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 193:393, 1993
83. SHERMAN PA, LAUBACH VE, WOOD ER: Purification and cloning of a cytokine-induced nitric oxide synthase from a human tumor cell line: *Biochemistry* 32:11600, 1993
84. WEINBERG JB, MISUKONIS MA, SHAMI PJ, MASON SN, SAULS DL, DITTMAN WA et al.: Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS Protein, Biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood*, 86:1184-1195, 1995
85. YANG CW, HWANG TL, WU CH, WU MS, LAI PC, HUANG JY et al.: Peritoneal nitric oxide is marker of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 11:2466-2471, 1996
86. DOUMA CE, DE WAART DR, ZEMEL D, IMHOLZ ALT, STRUIJK DG, KREDIET RT: Nitrate in stable CAPD patients and during peritonitis. *Adv Perit Dial*, 11: 36-40, 1995

87. KAPLOW LS: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride *Blood* Vol 26, No 2, 1965
88. PLUM J, MIRZA TABATABAEI M: Nitric oxide production in peritoneal macrophages from CAPD patients with bacterial peritonitis, *Perit Dial Int*, Vol.18, suppl. 2, 1998
89. LIN CY, HUANG TP: Gene expression and release of interleukin-8 by peritoneal macrophages and polymorphonuclear leukocytes during peritonitis in uremic patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 68:437-441, 1994
90. NAKANISHI I, MOUTABARRIK A, OKADA N et al.: Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 9:1435-1442, 1994
91. ZEMEL D, IMHOLZ AL, DEWAART D et al.: Appearance of tumor necrosis factor-alpha and soluble TNF-receptors I and II in peritoneal effluent of CAPD. *Kidney Int* 46:1422-1430, 1994
92. BREBOROWICZ A, WIECZOROWSKA K, KORYBALSKA K, POLUBINSKA A et al.: The effect of nitric oxide inhibitor (L-NAME) on peritoneal transport during dialysis in rats *Peri Dial Inter* 18: 188-192, 1998
93. COMBET S, VAN LANDSCHOOT M, MOULIN P, DEVUYST O et al.: Regulation of Aquaporin-1 and nitric oxide synthase isoforms in a rat model of acute peritonitis *J Am Soc Nephrol* 10: 2185-2196, 1999

94. DEVUYST O, COMBET S, CNOPS Y et al.: regulation of NO synthase isoforms in the peritoneum: implications for ultrafiltration failure in peritoneal dialysis *Nephrol Dial Transplant* 16: 675-678, 2001

95. COMBET S, MIYATA T, MOULIN P, DEVUYST O et al.: Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis *J Am Soc Nephrol* 11: 717-728, 2000

96. KONE BC: Nitric Oxide in Renal Health an Disease *American Jour of Kidney Diseases* Vol 30, No 3: 311-333, 1997

97. ARESE M, STRASLEY M, RUVA C et al.: Regulation of nitric oxide synthesis in uremia *Nephrol Dial Transplant* 10: 1386-1397, 1995

98. PASSAUER J, BÜSSEMAKER E, RANGE U, PLUG A et al.: Evidence in vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis *J Am Soc Nephrol* 11: 1727-1734, 2000

99. CHEN JY, CHIU JH, CHEN HL: Human peritoneal mesothelial cells produce nitric oxide: induction by cytokines, *Perit Dial Int*, Vol 20, suppl 6: 772-772, 2000

100. REILING N, ULMER AJ, DUCHROW M, ERNST M et al.: Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocyte/macrophages *Eur J Immunol* 24: 1941-1944, 1994

101. MOLLACE V, COLASANTI M, RODINO P, MASSOUD R, LAURO GM et al.: *Biochem Biophys Res Commun*, 191: 327-334, 1993
102. COLASANTI M, MOLLACE V, CUNDARI E, MASSOUD R, NISTICO G, LAURO GM: *Int J Immunopharmacol* 15: 763-771, 1993
103. GOODNOUGH LT, SAITO H: Specific binding of thrombin by human peripheral blood monocytes. *J Lab Clin Med* Vol 99, No 6, 873-883, 1982
103. SCHNEEMANN M, SCHOEDEN G, HOFER S, BLAU N, GUERRERO L, SCHAFFNER A: Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 167: 1358, 1993
104. PADGETT EL, PRUETT SB: Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 286:775, 1992
105. SAKAI N, MILSTIEN S: Availability of tetrahydrobiopterin is not a factor in the inability to detect nitric oxide production by human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 193:378, 1993
106. DENIS M: Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 55:682, 1994
107. ZEMBALA M, SIEDLAR M, MARCINKIEWKICZ J, PRYJMA J: Human monocytes are stimulated for nitric oxide release in vitro by

- some tumour cells but not by cytokines and lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 24:435, 1994
108. KOPPENOL WH, MORENO JJ, PRYOR WA et al.: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5:834-842, 1992
 109. CUNHA FQ, ASSREUY J, MONCADA S et al.: Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology* 79:408-411, 1993
 110. TOPLEY N, MACKENZIE R, JÖRRES A, COLES GA, DAVIES M, WILLIAMS JD: Cytokine networks in continuous ambulatory peritoneal dialysis: Interactions of resident cells during inflammation in the peritoneal cavity. *Perit Dial Inter* Vol 13 (Suppl 2), 1992
 111. BRULEZ HFH, VERBRUGH HA: First-line defense mechanisms in the peritoneal cavity during peritoneal dialysis. *Perit Dial Inter* Vol 15 (No 7) Suppl, 1995
 112. GOLDSTEIN CS, BOMALSKI JS, ZURIER RB, NELSON EG, DOUGLAS SD: Analysis of peritoneal macrophages in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Kidney Inter* 1984, 26, 733-40
 113. De FIJTER CWM, VERBRUGH HA, PETERS EDJ, OE PL, van der MEULEN J, VERHOEFF J, DONKER HJM: In vivo exposure to the currently available peritoneal dialysis fluids decreases the function of peritoneal macrophages in CAPD. *Clinical Nephrology* Vol 39, No 2, 75-80, 1993

114. PETERSON PK, GAZIANO E, SUHL HJ, DEVALON M, PETERSON L, KEANE F: Antimicrobial activities of dialysate-elicited and resident human peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1985, 49, 212-18
115. DOUVDEVANI A, RAPOPORT J, KONFORTI A, ZLOTNIK M, CHAIMNOVITZ C: The effect of peritoneal dialysis fluid on the release of IL-1 β and TNF α by macrophages/ monocytes. *Perit Dial Inter* Vol 13, pp 112-117, 1993,
116. DE FIJTER CWM, VERBRUGH HA, PETERS EDJ, OE PL, VAN DER MEULEN J, VERHOEFF J, DONKER HJM: In vivo exposure to the currently available peritoneal dialysis fluids decreases the function of the peritoneal macrophages in CAPD. *Clinical Nephrology* Vol 39, No 2, 75-80, 1993
117. TOPLEY N, ALOBAIDI HMM, DAVIES M, COLES GA, WILIAMS JD, LLOYD D: The effect of dialysate on peritoneal phagocyte oxidative metabolism. *Kidney Inter* Vol 34 (1988), pp 404-411
118. JÖRRES A, GAHL GM, TOPLEY N, NEUBAUER A, LUDAT K, MÜLLER C, PASSLICK-DEETJEN J: In vitro biocompatibility of alternative CAPD fluids; comparison of bicarbonate-buffered and glucose-polymer-based solutions. *Nephrol Dial Transplant* 9, 785-790, 1990
119. TOPLEY N, MACKENZIE R., PETERSEN MM: In vitro testing of a potentially biocompatible continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid. *Nephrol Dial Transplant* 6, 574-581, 1991)

120. PLUM J, ARTIK S, BUSCH T, SAHIN K, GRABENSEE B: Oral versus intraperitoneal application of clindamycin in tunnel: A prospective, randomized study in CAPD patients *Peri Dial Inter*, 1997

9. Danksagung

Ich danke ganz herzlich dem Direktor der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie der MNR-Klinik der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, Herrn Prof. Dr. med B. Grabensee, für die mir gewährte Möglichkeit, diese Studie in seiner Abteilung durchzuführen.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med J. Plum gilt der Dank für sein Vertrauen, mir dieses interessante Thema überlassen zu haben. Seine Ratschläge und seine Bereitschaft zur Diskussion ermöglichten einen Einblick in die wissenschaftliche Arbeit und den daraus folgenden klinischen Bezügen.

Außerdem danke ich ganz herzlich den Mitarbeiterinnen des nephrologischen Labors, vor allem jedoch Frau A. Plum, die mich in der Einführung und Organisation labortechnischer Arbeiten hilfreich unterstützte und mir zu jeder Zeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.