

**Der Einfluss von Hyaluronan
auf die Synthese von Fibrinolysefaktoren
in humanen peritonealen Mesothelzellen**

Eine Arbeit vor dem klinischen Hintergrund
der Peritonealdialyse

Matthias Sauter

Aus der Medizinischen Poliklinik – Innenstadt
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

**Der Einfluß von Hyaluronan auf die Synthese von Fibrinolysefaktoren
in humanen peritonealen Mesothelzellen**
Eine Arbeit vor dem klinischen Hintergrund der Peritonealdialyse

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Matthias Sauter
aus
Kempten/Allgäu
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med Th. Sitter
Mitberichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Bruns Priv.-Doz. Dr. med. V. Güllberg
Betreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. B. Löffler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	09.12.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1 Die Peritonealdialyse	3
2.1.1 Allgemeines zur Peritonealdialyse	3
2.1.2 Die peritoneale Membran	5
2.1.3 Störungen der peritonealen Membran	9
2.2 Mesothelzellbiologie	11
2.3 Das fibrinolytische System der Peritonealhöhle	13
2.3.1 Die Komponenten des peritonealen fibrinolytischen Systems	13
2.3.2 Die mesoheliale Regulation des peritonealen fibrinolytischen Systems	14
2.4 Ursache und Folgen peritonealer Fibrinablagerungen	16
2.4.1 Die Pathogenese von peritonealen fibrösen Ablagerungen	16
2.4.2 Chirurgische Eingriffe im Abdominalbereich	19
2.4.3 Bakterielle Peritonitis	20
2.4.4 Abakterielle Peritonitis und PD-induzierte Serositis	21
2.4.5 Peritoneale Fibrosierungssyndrome unter PD und ihre Folgen	24
2.5 Hyaluronan	27
2.5.1 Die Struktur von Hyaluronan	27
2.5.2 Hyaluronan und Mesothelzellen	28
2.5.3 Hyaluronan und Peritonealdialyse	30
3. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	33
4. Materialien und Methoden	35
4.1 Materialien	35
4.1.1 Materialien zur Zellkultur	35
4.1.2 Materialien zur Northern Blot Analyse	36
4.2 Methoden	37
4.2.1 Mesothelzellkultur	37
4.2.1.1 Präparation und Kulturbedingungen	37
4.2.1.2 Charakterisierung der Mesothelzellen	37
4.2.1.3 Passage in Kulturgefäße und Vorbereitung für die Experimente	40
4.3 Analyse der Antigen-Produktion von t-PA und PAI-1 in Mesothelzellen	40

4.3.1	Messung der t-PA Synthese in Mesothelzellen mittels ELISA	40
4.3.2	Messung der PAI-1 Synthese in Mesothelzellen mittels ELISA	41
4.4	Northern Blot Analyse	43
4.4.1	Präparation der Gesamt-RNA	43
4.4.2	Elektrophoretische Auftrennung der RNA	44
4.4.3	Blotten der elektrophoretisch aufgetrennten RNA	44
4.4.4	cDNA-Fragmente, Hybridisierung und Phosphor Imager	45
4.5	Statistische Auswertung	46
5.	Ergebnisse	47
5.1	Untersuchung der Auswirkung von HA auf die Proteinsynthese mesothelialer Fibrinolysefaktoren	47
5.1.1	Die Auswirkung von hochmolekularem HA auf die t-PA Synthese in Mesothelzellen	47
5.1.2	Die Auswirkung von hochmolekularem HA auf die PAI-1 Synthese in Mesothelzellen	49
5.1.3	Der Einsatz einer anderen HA-Präparation	51
5.2	Untersuchung der Auswirkung von HA auf die mRNA Expression mesothelialer Fibrinolysefaktoren	53
5.3	Untersuchung möglicher Wege der Signaltransduktion	56
5.4	Auswirkungen einer Koinkubation von TNF α und HA auf die t-PA Synthese in Mesothelzellen	60
6.	Diskussion	61
6.1	Das Zellkulturmodell	61
6.2	Das peritoneale Fibrinolyse-System unter dem Einfluß von HA	63
6.3	Signaltransduktion der durch HA induzierten Veränderungen in der Synthese mesothelialer Fibrinolysefaktoren	66
6.4	Hyaluronan in extramesothelialen Gerinnungs- und Fibrinolyseprozessen	68
6.5	Hyaluronan im Kontext inflammatorischer Gewebsreaktionen	70
6.6	Klinische Relevanz der Ergebnisse	73
7.	Zusammenfassung	75
8.	Literaturverzeichnis	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Activating Protein-1
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
BAL	Brochoalveoläre Lavage
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
c	Konzentration
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Emzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
GHSA	early Glycated Albumin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HA	Hyaluronan
HAS	Hyaluonansynthase
HD	Hämodialyse
His	Histidin
IL	Interleukin
ICAM	intercellular adhesion molecule
IgE	Immunglobulin E
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Low Density Lipoprotein Receptor
M199	Medium 199
MC	Mesothelzellen
m	Meter
Met	Methionin

Abkürzungsverzeichnis

MW	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
NF κ B	Nuclear Factor Kappa B
NAG	N-Acetyl-Glucosamin
PD	Peritonealdialyse
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PGI ₂	Prostazyklin
PGE ₂	Prostaglyndin E ₂
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAI-2	Plasminogen Aktivator Inhibitor 2
PAA	Plasminogen-Aktivorenaktivität
PMA	Phorbol 12-myristat 13-Acetat
PKC	Proteinkinase C
PDGF-BB	Plateled Derived Growth Factor-BB
PBS	Phosphate Buffered Saline
rtPA	rekombinantes t-PA
rpm	rotation per minute
Ser	Serin
Serpin	Serin-Proteinase-Inhibitor
SEP	Sclerosing Encapsulating Peritonitis
SDS	Dodecyl Natriumsalz
SSC	Salt Sodium Citrate
SEM	Standartmessfehler
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
t-PA	tissue-type Plasminogen Activator
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
U	Unit
u-PA	urokinase-type Plasminogen Activator
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Neben der Hämodialyse stellt die Peritonealdialyse (PD) ein häufig genutztes Verfahren zur Nierenersatztherapie dar: Über einen in die Peritonealhöhle eingebrachten Katheter wird die Peritonealhöhle mit hochosmolarer, glukosehaltiger Flüssigkeit befüllt. Gemäß dem dadurch entstandenen osmotischen Gradienten diffundieren dann sowohl die harnpflichtigen Stoffe als auch Wasser aus dem intravasalen Kompartiment in die Bauchhöhle, wobei das Peritoneum als semipermeable Membran dient. Wichtig ist, dass die Dialyselösung regelmäßig gewechselt werden muss, um den osmotischen Gradienten aufrecht zu erhalten und damit eine kontinuierliche Blutreinigung erzielt werden kann. Die regelmäßigen Wechsel, sowie die Verbindung zwischen „Aussenwelt“ und Peritonealhöhle mittels des Katheters stellen ein erhebliches Risiko für bakterielle Peritonitiden dar, die zu einer Fibrosierung des Peritoneums führen können. Darüber hinaus stellt die ständige Präsenz der PD-Lösung in der Bauchhöhle einen höchst unphysiologischen Zustand dar, der die peritoneale Homöostase gravierend stört. Die physikalischen und chemischen Irritationen des Bauchfells können zu einer sterilen Peritonitis führen, als deren Folge die Ultrafiltrationskapazität des Peritoneums abnimmt. Ursächlich hierfür ist unter anderem ein Verlust der das Peritoneum auskleidenden Mesothelzellen (MC) ebenso wie eine nachfolgende Fibrosierung. [35] Seit längerem ist bekannt, dass die MC ein vom plasmatischen Gerinnungssystem weitgehend unabhängiges, eigenes Fibrinolyse-System besitzen. Bei den oben erwähnten Fibrosierungsvorgängen spielen Ungleichgewichtszustände zwischen verschiedenen Faktoren des mesothelialen fibrinolytischen Systems eine entscheidende Rolle. Als Faktoren sind hierbei insbesondere Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) und dessen spezifischer Inhibitor (PAI-1) zu nennen. [140] [146]

Auf der Suche nach einem Agens, das den beschriebenen Risiken und Langzeitfolgen der PD entgegenwirken könnte, wurde von mehreren

Einleitung

Arbeitsgruppen vorgeschlagen, der PD-Lösung Hyaluronan (HA) zuzusetzen. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass sich die Ultrafiltration durch Zugabe des hochmolekularen Polysaccharids HA in einer Konzentration von 10mg/dL signifikant verbessern lässt. [20] Ebenso scheint eine Zugabe von HA die peritonealen Transportcharakteristika für eine längere Zeit aufrecht zu erhalten als in der Kontrolle. [55]

Vor dem Hintergrund der Schlüsselrolle des mesothelialen Fibrinolysesystems in der Pathogenese von Komplikationen unter der PD war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen von HA auf die Produktion von t-PA und PAI-1 in Mesothelzellen zu untersuchen. Die Experimente wurden an Kulturen humaner peritonealer Mesothelzellen durchgeführt, die durch enzymatische Disaggregation aus Operationspräparaten des Omentum majus gewonnen wurden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Die Peritonealdialyse

2.1.1 Allgemeines zur Peritonealdialyse

Die Peritonealdialyse wurde von Ganter 1913 zum ersten Mal an Meerschweinchen beschrieben: Er injizierte zu diesem Zweck intraperitoneal 0,9%ige Kochsalzlösung. [46] Dieses Verfahren wurde weiterentwickelt, bis in den späten 1970er Jahren die kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse (CAPD) eingeführt wurde. [5] Die derzeitige Anzahl der hiermit behandelten Patienten wird auf über 100000 geschätzt, wobei die Zahlen natürlich ständig ansteigen. [109]

Die PD stellt eine in bestimmten Situationen gleichwertige Alternative zur Hämodialyse (HD) dar, wobei Unterschiede bezüglich der Mortalität kontrovers diskutiert werden. [5] Bei der HD ist die Effizienz des Stoffaustausches dadurch gewährleistet, dass hier eine große Austauschfläche über die künstliche Membran zur Verfügung steht, die Dialysekompartimente eng nebeneinander liegen und ein schneller, entgegengesetzter Blut- und Dialysatfluß erzielt werden kann. [5] In der PD ist die Größe der Austauschmembran von der Natur vorgegeben und nur das Dialysat steht mit ihr in direktem Kontakt. Das Blutkompartiment wird hingegen durch eine unterschiedlich dicke Bindegewebsschicht von der Membran getrennt. [5] Während die HD jedoch einen mehrstündigen Aufenthalt in einem Dialysezentrum mehrmals pro Woche erfordert, kann die PD vom Patienten selbst durchgeführt werden. Doch auch dies kann für den einzelnen Patienten unter Umständen belastend und mit Schwierigkeiten behaftet sein kann. Die PD erfordert vom Patienten die Einhaltung steriler Bedingungen, um das Eindringen von Bakterien über den intraperitoneal gelegenen Katheter zu vermeiden, welches Ursache einer Peritonitis (z.B. durch Keime der Hautflora wie Staphylococcus epidermidis) sein kann. [5] Dafür benötigt ein PD-Patient keine Antikoagulation und läuft nicht Gefahr, hypotone Episoden durch abrupte

Veränderungen des Volumens und der Osmolarität zu erleiden, wie sie bei der HD häufig sind.

Das Ziel der Dialyse ist zum einen die Entfernung von toxischen Substanzen (= solute clearance), was in der PD durch Diffusion vonstatten geht. Zum anderen muss aber auch der Entzug von großen Flüssigkeitsmengen (1-3 l/Tag) gewährleistet sein, was als „Ultrafiltration“ bezeichnet wird und unter dem osmotischen Einfluss des Dialysats vonstatten geht. [102] Um diesen osmotischen Gradienten aufbauen zu können, enthalten gängige kommerzielle Dialyselösungen D-Glucose in 1.36, 2.27, 3.86 oder 4.25%(w/v)iger Konzentration. Davon befinden sich ca. zwei Liter ständig in der Peritonealhöhle. Diese hohe Glucosebelastung bedingt unter Umständen die Exazerbation eines Diabetes mellitus oder erschwert die Therapie der bestehenden Erkrankung.

Ein weiteres großes Problem der PD ist die Schädigung der peritonealen Membran durch den Dialysevorgang, bzw. die Dialyselösungen. Dies limitiert oftmals die Zeit an der PD. Auf die peritoneale Membran und ihre PD-bedingten Schädigungen wird im folgenden näher eingegangen.

Die folgende Tabelle veranschaulicht noch einmal die Vor- und Nachteile der PD.

Vorteile	Nachteile
Steady state Hämostase	Exzessive Glucosebelastung
Hoch permeable Membran entfernt Peptide	Andauerndes Erfordernis eines sterilen Flüssigkeitsaustausches
Bessere hämodynamische Toleranz	Zeitaufwändiger Flüssigkeitsaustausch
Einfache Durchführung	Proteinverlust
Niedrigeres extrazelluläres Flüssigkeitsvolumen	Peritoneum ist sensibel und kann leicht verletzt werden
Keine Abhängigkeit von Maschinen	Peritonitis
Leicht zu erlernen	

Tab. 1 Vor- und Nachteile der PD. Zusammenstellung nach Bailie und Eisele [5]

2.1.2 Die peritoneale Membran

Kernstück der PD ist die Peritonealmembran, über welche als semipermeable Trennschicht die Clearance von Abfallstoffen sowie die Ultrafiltration von statten gehen. Auf die Peritonealmembran soll im folgenden näher eingegangen werden.

Zuerst zur Begriffsklärung: Unter „Peritonealmembran“ werden alle zellulären und extrazellulären Elemente zusammengefaßt, die sich auf der Strecke zwischen den peritonealen Austauschgefäßen (Kapillaren und postkapilläre Venolen) und der Peritonealhöhle befinden. [102] Vom Kompartiment des Dialysats - der Peritonealhöhle - aus gesehen, bilden die Mesothelzellen (MC) als oberste Schicht die erste, zelluläre Barriere. Beide großen Körperhöhlen (Thorax und Abdomen) werden von MC ausgekleidet. Dadurch ermöglichen sie neben ihrer Funktion als Schutzschicht die reibungsarme Bewegung der in den Höhlen enthaltenen Organe bei der Respiration bzw. der Darmperistaltik. [37]

Die MC beteiligen sich aktiv am Transport von löslichen (Abfall-) Stoffen und Flüssigkeit, was zumindest teilweise über plasmalemmale Vesikel vonstatten geht. [53] Darüber hinaus produzieren MC eine Vielzahl von Botenstoffen und nicht zuletzt Mediatoren der peritonealen Fibrinolyseaktivität, welche Gegenstand dieser Arbeit sind.

Die MC sind untereinander epithelartig mittels tight junctions verbunden, [131] [98] was sie zu einer Barriere für den Austausch von Wasser, löslichen Stoffen und Zellen macht. Es gibt Hinweise dafür, dass diese tight junctions veränderbar sind und so eine Regulation des Salz- und Wassertransports ermöglichen. [33] Mittels Ankerproteinverbindungen sind MC nicht nur untereinander sondern auch mit der darunterliegenden Basalmembran (BM) verbunden. [131] [98] Diese BM - vermutlich von MC produziert [124] - besteht aus einem extrem dünnen Netzwerk von Kollagen Typ IV, [29] Proteoglykanen und Glykoproteinen, wie beispielsweise Laminin. [102] Sie dient als selektive Barriere für Zellen, indem sie z.B. Fibroblasten davon abhält, mit MC in Kontakt zu treten, während Makrophagen und Lymphozyten ungehindert passieren können. [102] Desweiteren spielt die BM eine wichtige Rolle bei der Regeneration von MC-Schädigungen, indem sie eine Schiene bildet, entlang derer die MC wachsen können. [102] [29]

Unter der BM befindet sich das submesotheliale Bindegewebe (BG) (synonym: extrazelluläre Matrix (ECM)). Kollagenfasern (v.a. vom Typ I und III [124]) verleihen diesem die nötige Festigkeit, absorbieren Spannung und bilden ein organisiertes Gitternetz, in dem sich Zellen bewegen und miteinander interagieren können. Proteoglykane, die Gelstrukturen verschiedener Porengröße und Ladung bilden, dienen als molekulare Siebe, um den Makromolekül- und Zelltransport über die peritoneale Membran entsprechend ihrer Größe und Ladung zu koordinieren. [102] Die Wasserphase des Interstitiums erlaubt den Transport von Wassermolekülen, Elektrolyten, Nahrungsbestandteilen, Metaboliten, Hormonen und Gasen zwischen dem Blut und den anderen Zellen.

[102] Die ECM beeinflusst auch die Proliferation, die Gestalt und die metabolische Funktion der in ihr befindlichen Zellen. [120]

In der ECM befinden sich verschiedene Zelltypen, die unterschiedliche Aufgaben in der Peritonealmembran wahrnehmen: Fibroblasten produzieren die Makromoleküle (v.a. Kollagen), aus denen die ECM besteht. Über die Sekretion von IL-6 und IL-8 tragen sie wahrscheinlich auch zum „recruitment“ von Leukozyten in die entzündete Bauchhöhle bei. [78] [77] Gewebsmakrophagen, die sich meist in der Nähe der mesothelialen BM und der Blutgefäße befinden, [137] produzieren eine Vielzahl von Zytokinen (wie beispielsweise TGF β , PDGF und TNF α), die eine wichtige Rolle bei peritonealen Entzündungen und auch bei der Modulation einer peritonealen fibroproliferativen Reaktion spielen. [44]

Die sich ebenfalls im submesothelialen BG befindlichen Mastzellen sind vermutlich bei initialen Stadien der peritonealen Adhäsionsbildung beteiligt. [86] Als Antwort auf immunologische Stimulation oder toxische Irritation setzen sie durch Degranulation eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin, lysosomale Enzyme, Chemotaxine, Zytokine und Sauerstoffradikale frei. [97]

Blutgefäße transportieren Nährstoffe zu den Geweben und Organen und dienen außerdem der Entfernung von Abfallstoffen. Der normale Austausch geschieht in den Kapillaren und postkapillären Venolen; die Permeabilität der Austauschgefäße steht dabei vermutlich unter endothelialer Kontrolle, wobei hier aber viele Aspekte noch ungeklärt sind. Während Kapillaren, die in der gesamten Peritonealmembran vorkommen, vermutlich für den „normalen“ Austausch zuständig sind, [150] werden die postkapillären Venolen in den „Milchflecken“ des Omentum majus als Hauptquelle von Plasmaproteinen und Leukozytenextravasaten während Peritonitiden angesehen. [38]

Eine erfolgreiche Blutreinigung durch die PD ist unweigerlich mit der Integrität der Peritonealmembran verknüpft. Diese ist jedoch durch die PD gefährdet, worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird.

Die folgende Skizze soll die Anordnung der verschiedenen Komponenten der peritonealen Membran noch einmal veranschaulichen.

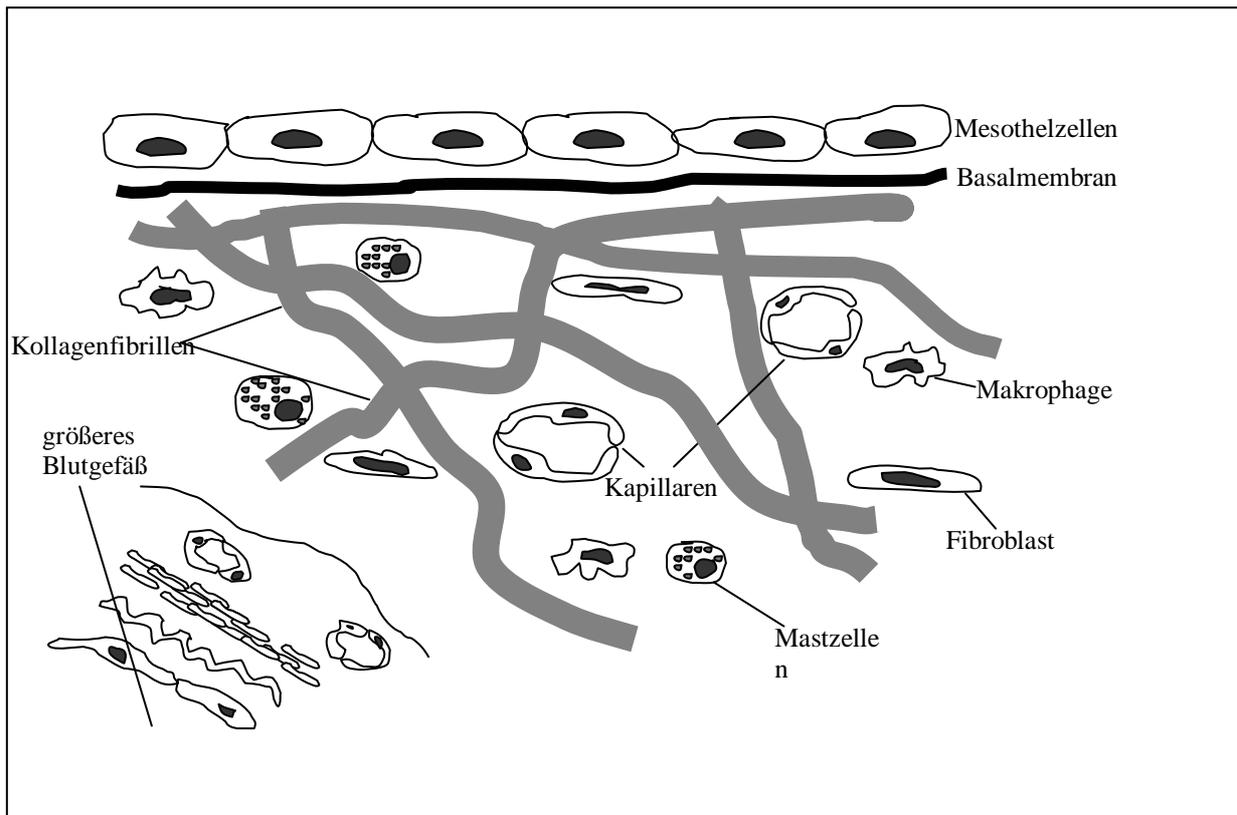


Abb. 1: schematischer Aufbau der peritonealen Membran

2.1.3 Störungen der peritonealen Membran durch die PD

Die PD stellt einen chronischen Verletzungsprozess der peritonealen Membran dar. Die permanente Exposition gegenüber den Dialyselösungen führt bei vielen Patienten zu morphologischen und funktionellen Veränderungen, deren Ausprägungsgrad sich proportional zur PD-Dauer verhält. [34] [61] Morphologisch findet sich beispielsweise ein Verlust von mesothelialen Mikrovilli bereits wenige Tage nach Dialysebeginn. [32] Außerdem wird eine Desorganisation der normalen Kollagenfasern, sowie eine Vermehrung der ECM-Grundsubstanz beschrieben. [34] Hinsichtlich funktioneller Störungen wächst das Risiko eines „ultrafiltration failure“ von 2,6% nach einem Jahr auf 30,9% nach sechs Jahren PD an. [61]

Der Prozess der Peritonealdialyse ist hochgradig unphysiologisch und führt zu verschiedensten Störungen der intraperitonealen Homöostase. [17] Normale PD-Lösungen unterscheiden sich von physiologischen Flüssigkeiten durch ihren niedrigen pH-Wert (pH um 5,2 d.h. es sind 6000 nmol/L H_3O^+ -Ionen gegenüber 40 nmol/L H_3O^+ -Ionen bei pH 7,4 enthalten!), durch ihre hohen Glucosekonzentrationen (bis zu 400mg/dL) und durch die erhöhte Lactatkonzentration, die mit 30-40 mmol/L den normalen Serumspiegel um ein mehrfaches überschreitet. [16] Mittels in vitro-Studien konnte die Zytotoxizität der Dialyselösungen gegenüber MC auf Grund des erhöhten Protonen- und Lactatgehaltes, sowie der Hyperosmolarität - bedingt durch hohe Glucosekonzentrationen - nachgewiesen werden. [85] [76] In Kontakt mit PD-Lösungen sezernieren MC weniger Prostaglandine und Phospholipide. [31] [152] Ebenso sinkt die intrazelluläre Konzentration an Glutathion, das als Antioxidans zytoprotektiv wirkt. [18]

Glucose schädigt die peritoneale Membran gleich in zweifacher Hinsicht: Zum einen trägt es zur Langzeit-Toxizität von PD-Lösungen durch die Glykosilierung von peritonealen Proteinen bei; [30] zum anderen induziert Glucose TGF β in

MC, was die Entwicklung einer peritonealen Fibrose fördert. [96] Als Ausdruck der peritonealen Irritation durch die PD findet sich vermehrtes Auftreten und Aktivierung von verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, [12] eosinophilen [36] und neutrophilen Granulozyten [17] (siehe Kapitel 2.4.2 und 2.4.3).

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die PD für viele Patienten gravierende Folgen hinsichtlich der Struktur und Funktion ihrer Peritonealmembran haben kann. HA wird in verschiedenen Arbeiten immer wieder als protektive Substanz hinsichtlich dieser Veränderungen beschrieben (s. 2.5.3). Gegenstand dieser Arbeit ist es, den Einfluss von HA auf die Produktion von mesothelialen Fibrinolysefaktoren zu untersuchen, die in der Entstehung von peritonealen Fibrosen eine Schlüsselrolle spielen. (s. 2.3)

2.2 Mesothelzellbiologie

Mesothelzellen kleiden als oberste, einlagige Zellschicht die serösen Höhlen aus. Außer in der Abdominal- und Thorakalhöhle finden sich Mesothelzellen auch im Herzbeutel und in der Umhüllung des Hodens. In der Peritonealhöhle bedecken sie eine Fläche von 1 – 2 m². [127] Beim Erwachsenen entspricht dies einer Anzahl von ungefähr 4 x 10⁹ Zellen. [102]

Entwicklungsgeschichtlich sind die MC mit den Endothelzellen verwandt, woraus sich Ähnlichkeiten in Morphologie und Stoffwechsel ergeben. [144] Eine wichtige Aufgabe der MC ist es, eine reibungsarme Beweglichkeit der von ihnen bedeckten Organe zu gewährleisten. Zu diesem Zweck sezernieren MC verschiedene Stoffe, wie z.B. Phosphatidylcholin, das in den sogenannten „lamellar bodies“ enthalten ist. [102] Über die Funktion der MC als Schutzschicht und im transperitonealen Flüssigkeitstransport wurde bereits eingegangen (s. 2.1.2). MC weisen eine polare Ultrastruktur mit einer apikalen Seite (die Mikrovilli ausbildet) und einer basolateralen Seite (welche die Verbindungen zur BM und zu den benachbarten Zellen herstellt) auf. [102] In Kultur konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Zytokine wie IL-6 und IL-8 v.a. von der apikalen Seite sezerniert werden. [157] [158]

MC sind an der Produktion und am „Remodelling“ der ECM beteiligt: Sie synthetisieren Kollagen (Typ I, III, IV), Elastin, Fibronectin und Laminin [123], wobei die Kollagensynthese durch Zytokine (wie z.B. TNF α) moduliert werden kann. [115] Auch eine Reihe von Proteoglykanen wird durch MC synthetisiert: Hier ist Hyaluronan ebenso zu nennen wie Biglycan und Decorin. [63] [155] [99] Die beiden letztgenannten Proteoglykane sind in der Lage, über ihr Core-Protein den Wachstumsfaktor TGF β zu binden. Diese Sequestrierung wirkt TGF β -induzierten peritonealen Fibrosierungen entgegen. [102] MC sezernieren aber auch Enzyme wie Gelatinase und Kollagenase, die an der Degradation der ECM beteiligt sind. [92] [90]

In Abwehrreaktionen spielen MC ebenfalls eine entscheidende Rolle. So produzieren sie Prostaglandine (z.B. PGI₂, PGE₂) und sind durch die Produktion von Chemokinen (z.B. IL-1 β und IL-6) an der Chemotaxis von Leukozyten und durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) an der Adhäsion von Zellen des Immunsystems beteiligt. Durch eine differenzierte Regulation dieser Faktoren spielen MC eine Schlüsselrolle in der Kontrolle peritonealer Entzündungen. [102] Nicht zuletzt haben MC die Fähigkeiten, selbst Bakterien aufzunehmen und abzubauen, [101] sowie Antigene zu präsentieren. [142]

MC besitzen ein eigenes, vom Plasma unabhängiges fibrinolytisches System, dessen Hauptfaktoren t-PA und PAI-1 ein wesentlicher Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Deshalb soll auf dieses komplexe System in einem eigenen Kapitel eingegangen werden. (s. 2.3)

2.3 Das fibrinolytische System der Peritonealhöhle

2.3.1 Die Komponenten des peritonealen fibrinolytischen Systems

Wie bereits oben erwähnt, besitzt die Peritonealhöhle ein vom Plasma unabhängiges fibrinolytisches System. Die Wirkung jedes fibrinolytischen Systems besteht darin, Fibrin durch Plasmin zu Fibrin-Degradationsprodukten abzubauen. Plasmin entsteht aus Plasminogen durch die Einwirkungen von Plasminogenaktivatoren.

In MC werden die Plasminogenaktivatoren tissue-type plasminogenactivator (t-PA) [144] und urokinase-type plasminogenactivator (u-PA), [133] sowie deren Inhibitoren Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2) produziert. [144] Dies geschieht in einem noch stärkeren Ausmaß als in Endothelzellen, die als ein Hauptproduktionsort für die erwähnten Stoffe angesehen werden. [66] Als Hauptfaktoren sind am peritonealen Fibrinolyse-System allerdings vorrangig t-PA und PAI-1 beteiligt: t-PA ist verantwortlich für über 95% der peritonealen Plasminogenaktivatorenaktivität (PAA), [66] wohingegen u-PA in mehreren Arbeiten im Zellkulturüberstand überhaupt nicht nachgewiesen werden kann. [144] [133] PAI-2 wird zwar von MC synthetisiert, aber in der Zelle zurückgehalten, [102] [144] während PAI-1 sezerniert wird. Aus diesem Grund beschränken sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf HA-bedingte Veränderungen der t-PA- und PAI-1-Produktion.

Zur molekularen Struktur dieser beiden Mediatoren sollen nun noch einige Anmerkungen gemacht werden:

Humanes t-PA ist eine 527 Aminosäuren (AS) lange Serin-Proteinase, [117] die in einer einkettigen oder - durch Peptidspaltung zwischen zwei AS bedingten und durch eine Disulfidbrücke verbundenen - zweikettigen Form vorkommt. Das Protein besteht aus vier Domänen: einer F-Domäne, homolog den Fingerdomänen des Fibrins, welche die Affinität zu Fibronectin vermitteln; einer

E-Domäne, homolog dem human epidermal growth factor; zwei K-Domänen (K₁ und K₂), die große Ähnlichkeit mit den fünf „kringles“ des Plasminogen aufweisen und einer Serin-Proteinase-Domäne, deren aktives Zentrum die AS His³²², Asp³⁷¹ und Ser⁴⁷⁸ bilden. [26] Das Molekulargewicht von t-PA beträgt ungefähr 65000 Da.

PAI-1 ist ein einkettiges Glykoprotein aus 379 Aminosäuren (Molekulargewicht 52000 Da), das zur Familie der Serin-Proteinase-Inhibitoren (Serpine) gehört. Das aktive Zentrum wird von der Peptidbindung Arg³⁴⁶ – Met³⁴⁷ gebildet. [110] [116] Es interagiert sowohl mit ein- als auch mit zweikettigem t-PA. [79]

2.3.2 Die mesotheliale Regulation des peritonealen Fibrinolyse-Systems

Wie bereits dargelegt spielen MC eine entscheidende Rolle für das peritoneale fibrinolytische System: Sie synthetisieren dessen Komponenten und sezernieren diese in die Peritonealhöhle. (Siehe 2.3.1) Insofern liegt es nahe, dass das empfindliche Gleichgewichtssystem zwischen Fibrinbildung und Abbau durch differenzierte Synthese der einzelnen Komponenten in MC zumindest mitreguliert wird. Van Hindsbergh et al. konnten zeigen, dass die Inkubation von MC mit TNF α , einem wichtigen, u.a. von Makrophagen produziertem Entzündungsmediator, zu einem enormen Abfall der t-PA Produktion führt. Die PAI-1 Synthese steigt dagegen unter Stimulation mit TNF α deutlich an. Gleichsam führt die Stimulation mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) (wie sie z.B. bei einer Peritonitis mit gramnegativen Keimen vorliegt) zu einer erhöhten PAI-1 und erniedrigten t-PA Synthese, wiewohl dieser Effekt geringer ausgeprägt ist als bei der Stimulation durch TNF α . [144]

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Butyrat die t-PA Synthese in unstimulierten MC steigert, während all-trans-Retinsäure und der Protein-Kinase-C-Aktivatoren PMA hier keinen Effekt aufweisen. (Alle drei

Verbindungen bewirken eine Steigerung der t-PA Produktion in Endothelzellen. [144]) Für die PKC kann eine volle Aktivierung bereits unter basalen Bedingungen ausgeschlossen werden, da der PKC-Inhibitor Ro-318220 keinen Effekt auf die basale t-PA Produktion hat. Allerdings vermag Ro-318220 ebenso wie der Tyrosinkinasehemmer Genistein den TNF α -induzierten t-PA Abfall in MC partiell zu antagonisieren. [133]

Eine Aktivierung der Adenylatzyklase (mit Anstieg des second transmitters cAMP) durch Forskolin vermindert sowohl die t-PA als auch die PAI-1 Produktion in MC.

Hinsichtlich der PAI-1 Synthese zeigt auch eine Hemmung der Tyrosinkinase durch die Isoflavonverbindung Genistein und eine Hemmung der PKC durch Ro-318220 einen suppressiven Effekt sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter Stimulation mit TNF α . [133]

Eine erhöhte Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und activator protein-1 (AP-1) wird bei der Inkubation von MC mit early glycated albumin (GHSA), das in der Peritonealhöhle nichtenzymatisch beim Kontakt mit der glucosehaltigen PD-Flüssigkeit entsteht, beschrieben. Als Reaktion auf GHSA kommt es zu einem konzentrations- und zeitabhängigen PAI-1-Anstieg, der auf einer vermehrten Transkription - wahrscheinlich unter Beteiligung der beiden erwähnten Transkriptionsfaktoren - beruht. [91]

Darüber hinaus können Mesothelzellen t-PA (und auch u-PA) über rezeptorvermittelte Endozytose internalisieren und abbauen. Dieser Regulationsweg kommt im plasmatischen Fibrinolysesystem nicht vor, bei dem t-PA hauptsächlich von Gefäßendothelzellen produziert und dann in Leberendothel- und Parenchymzellen abgebaut wird. [114] [104] [113] [135] Mesothelzellen internalisieren t-PA mittels des low density lipoprotein receptor related proteins (LRP), [134] das auch in Leberparenchymzellen für die t-PA-Endozytose verantwortlich ist. [113] [135]

2.4 Ursachen und Folgen peritonealer Fibrinablagerung

2.4.1 Die Pathogenese von peritonealen fibrösen Ablagerungen

In der Entstehung von fibrösen Ablagerungen spielt die gestörte Balance des mesothelialen Fibrinolyse-Systems eine Schlüsselrolle, da entstandenes Fibrin in der Bauchhöhle verbleibt und von einwandernden Zellen und einsprossenden Kapillaren organisiert wird. [66] Verschiedene Studien konnten diese Kausalitätshypothese erhärten: So wurden Kaninchen einem abdominalen operativen Eingriff unterzogen und dann entweder mit dem Fibrinolyseinhibitor Tranexamsäure oder mit rekombinantem t-PA (rtPA) behandelt. Hierbei steigerte Tranexamsäure die Adhäsionsbildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während rtPA Zahl und Ausmaß der Adhäsionen gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant verringerte. [68]

Die Pathogenese von peritonealen Fibrinablagerungen ist relativ uniform: Eine Schädigung der MC zieht eine überschießende Fibrinexsudation nach sich. [40] [24] [75] Hertzler konnte bereits 1919 die peritoneale Reaktion gegenüber bakteriellen und chemischen Noxen lichtmikroskopisch nachweisen. Er fand als frühestes Ereignis ein Hindurchsickern fibrinreichen Exsudats zwischen den MC. Schritt dieser Prozess fort, wurde das Mesothel ganz vom Fibrin eingeschlossen und die Zellen veränderten ihre Form. Wenn der auslösende Reiz andauerte, sammelte sich Fibrin im submesothelialen Stroma und die MC degenerierten und verschwanden. Wurde der Stimulus unterbrochen, überlebten die MC und das Fibrin wurde reabsorbiert. [64]

Heute wissen wir, dass die Auflösung des Fibrins im wesentlichen durch das intraperitoneale Fibrinolyse-System vonstatten geht, welches gerade durch inflammatorische Reize beeinträchtigt sein kann. [66] Überschreiten die intraperitonealen Fibrinablagerungen die Degradationskapazität, bilden diese ein Gerüst, in welches Fibroblasten einwandern und Kapillaren einsprossen. Durch diese Organisation werden sie zu fibrösen Adhäsionen. [66]

Theoretische Grundlagen

Die anschließende Grafik stellt noch einmal die pathogenetischen Zusammenhänge der intraperitonealen Fibrinablagerungen und deren Organisation dar.

In den folgenden Kapiteln möchte ich exemplarisch einige wichtige krankhafte und/oder iatrogene Zustände aufzeigen, die mit einem wesentlich erhöhten Risiko einhergehen, peritoneale Adhäsionen und Fibrinablagerungen zu entwickeln.

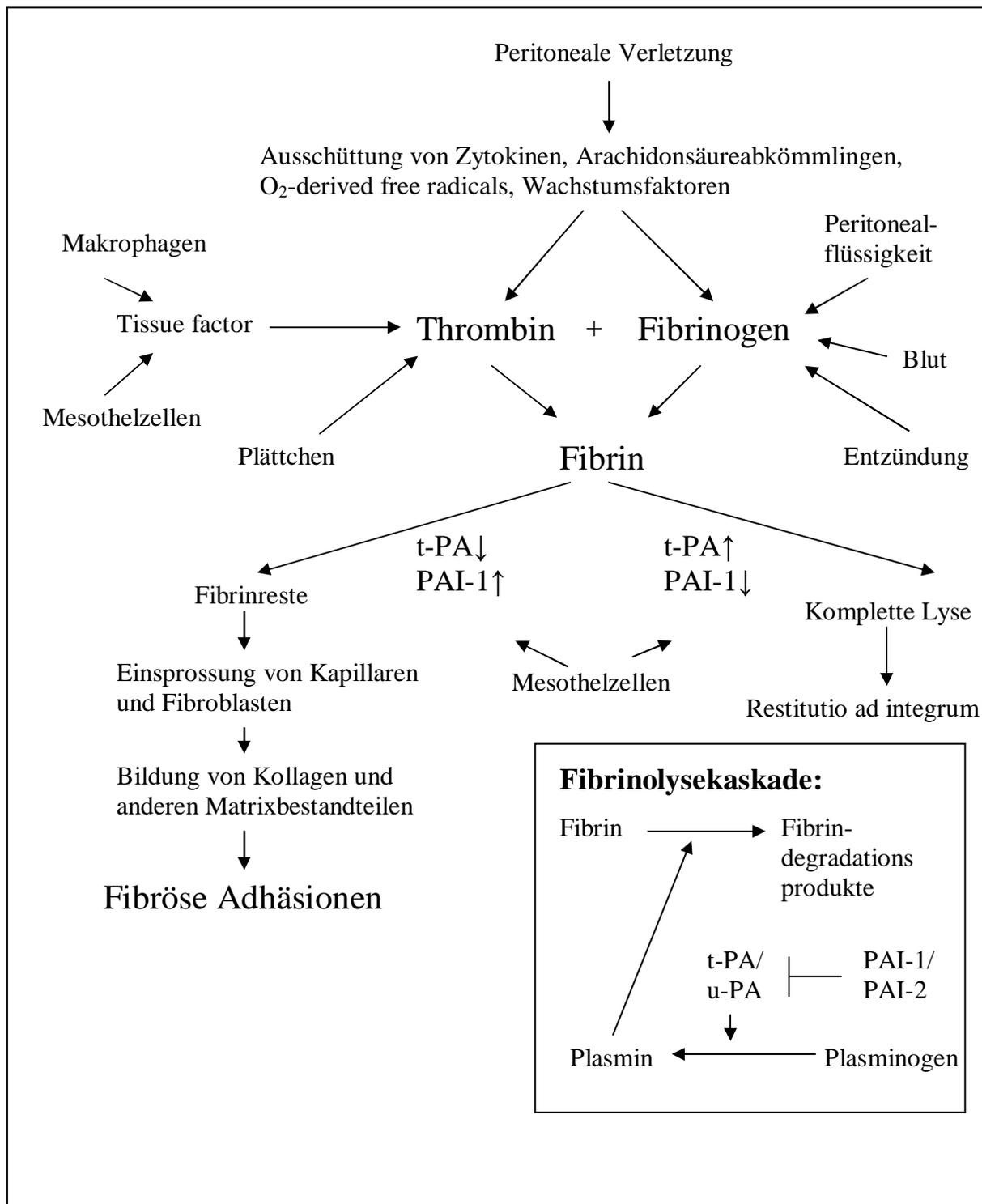


Abb. 2: Die Zusammenwirkung der fibrinolytischen Faktoren

2.4.2 Chirurgische Eingriffe im Abdominalbereich

Adhäsionen, die nach chirurgischen Eingriffen in der Peritonealhöhle auftreten, sind ein weitverbreitetes Problem. Eine international angelegte Multicenterstudie zeigte, dass 100% von 448 erwachsenen Patienten, die mindestens einmal im Abdominalbereich operiert wurden, zumindest eine und teilweise bis über zehn Adhäsionen entwickelten. [88] Für das Auftreten von Adhäsionen spielen – wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben – Ungleichgewichtszustände zwischen Fibrinolyseaktivatoren und deren Inhibitoren eine entscheidende Rolle, da so das Gleichgewicht zwischen Fibrinbildung und -degradation verschoben wird. Bei chirurgischen Eingriffen stellen z.B. Nähte im Peritonealbereich einen solchen Stimulus zur Verschiebung dieses Gleichgewichtes dar. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass bei Ratten peritoneale Defekte, die vernäht wurden, signifikant öfter zu Adhäsionen führten, als solche die nicht genäht wurden. [67] Eine Erklärung dafür ist, dass Nähte durch den erforderlichen Zug an den Wundrändern zu lokalen Zirkulationsstörungen und damit zu lokaler Ischämie führen können. Ischämien werden wiederum als potente Trigger einer PAA-Reduktion angesehen. [21] [119] Dieses pathogenetische Prinzip spielt vermutlich auch eine Rolle beim Einsatz von Wundhaken. Hier ist ebenfalls die lokale fibrinolytische Kapazität reduziert. [66]

Jede Operation birgt aber auch das Risiko, dass Fremdmaterialien in die Abdominalhöhle eingebracht werden. Stärkepulver von Handschuhen stellt beispielsweise ein solches Material dar. Es zeigte sich im Tierversuch bei der Verwendung von mit Stärke gepuderten Operationshandschuhen eine erhöhte Inzidenz von Adhäsionen. [69] In Kultur erniedrigt Stärkepulver die durch Mesothelzellen bedingte PAA, indem die PAI-1-Synthese erhöht und die t-PA-Synthese komplett unterbunden wird. [66]

Eine gravierende postoperative Komplikation stellt die Entwicklung einer Peritonitis dar; die Auswirkung solcher peritonealer Entzündungszustände auf das lokale Fibrinolysesystem soll im nächsten Kapitel beleuchtet werden.

2.4.3 Bakterielle Peritonitis

Wie bereits erwähnt, sind bakterielle Peritonitiden gravierende Komplikationen sowohl bei chirurgischen Eingriffen im Abdominalbereich als auch bei der Nierenersatztherapie mittels PD. Erkrankungen wie beispielsweise Appendizitiden, Ulcusperforationen im Gastral- und Duodenalbereich sowie Divertikelperforationen können ebenfalls bakterielle Peritonitiden nach sich ziehen und machen eine chirurgische Intervention unabdingbar. Je nach Ätiologie differiert das Spektrum der auslösenden Keime: In Peritonitiden, die durch Perforation des Darmes (iatrogen oder durch andere Ursachen bedingt) entstanden sind, finden sich naturgemäß vor allem die gramnegativen Keime der Darmflora wie *Escherichia coli*. [42] Dagegen beruhen bakterielle Peritonitiden von PD-Patienten am häufigsten auf Infektionen mit grampositiven Keimen wie *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*, die über den intraperitoneal gelegenen Katheter einwandern können. [5] Unabhängig von der Spezies führen bakterielle Stimuli allerdings zu einer relativ gleichförmigen Antwort des Peritoneums, die durch Mesothelzellen und peritoneale Makrophagen getriggert wird. [42]

Bei in vivo-Studien konnte sowohl in chirurgischem Krankengut, [72] [146] als auch in PD-Patienten [52] eine Reduktion der PAA bei Peritonitispatienten gegenüber den Kontrollpatienten festgestellt werden.

Auch auf zellulärer Ebene konnte dies nachgewiesen werden. LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Keime senkt in vitro die t-PA- und steigert die PAI-1-Produktion in MC. [132] Eine Arbeit beschreibt die Auswirkung von verschiedenen hitzeinaktivierten Bakterienstämmen auf die

mesotheliale PAI-1-Synthese. Inkubation mit *Escherichia coli* steigerte die PAI-1-Synthese 1,5fach, Inkubation mit *Staphylococcus epidermidis* 2,5fach und mit *Staphylococcus aureus* 3,5fach gegenüber der Kontrolle. Interessanterweise konnte dieser PAI-1-Anstieg durch Hemmung der IL-1 α -Aktivität mit einem neutralisierenden Antikörper signifikant reduziert werden, was diesem Zytokin eine Schlüsselrolle in bakteriell induzierten Veränderungen des Fibrinolysesystems zuweist. [91]

2.4.4 Abakterielle Peritonitis und PD-induzierte Serositis

Neben der erwähnten bakteriellen Peritonitis kommen auch abakterielle oder „sterile“ Peritonitisformen vor. Dobbie schlägt für diese Entität den Begriff der Serositis vor, den ich im folgenden ebenfalls verwenden will. Histopathologisch zeigt sich hier ein relativ homogenes Bild mit entzündlichen Stromainfiltrationen, v.a. aus mononukleärer Zellen bestehend, zum Teil aber auch vermischt mit neutrophilen oder eosinophilen Granulozyten. Eine schwere Serositis zeigt sich durch den Verlust der MC und einer Fibrinexsudation. Ätiologisch kommen für eine Serositis viele Faktoren in Frage, die in diesem Rahmen nur kurz gestreift werden können: Metabolische Gründe für eine Serositis können Urämie, sowie auch intraperitoneal erhöhtes Cholesterol (vermutlich durch gesteigerte mesotheliale Produktion) sein. Auch Viren können Auslöser einer Serositis sein: Hier ist insbesondere das Hepatitis-B Virus (bei HD-Patienten) zu nennen. Als Autoimmunerkrankungen können sowohl der Systemische Lupus Erythemathodes als auch das rheumatische Fieber und Autoimmunendokrinopathien eine sterile Entzündung des Peritoneums verursachen. Auslöser können auch Medikamente (z.B. β -Blocker, Vancomycin, Daunorubicin) sein. Eine genetisch bedingte Form (vermutlich durch einen C5a-Inhibitor-Mangel) kommt ebenfalls vor und wird auch familiäres Mittelmeerfieber genannt. Während metabolisch- und medikamenteninduzierte

Serositiden regelhaft zu einer peritonealen Fibrose führen, kommt diese trotz des vorhandenen fibrinösen Exsudats bei den anderen genannten Formen eher selten vor. [36]

Eine weitere Serositisform, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll, ist die PD-induzierte Serositis. Dass diese bei PD-Patienten kein seltenes Problem darstellt, wird schon dadurch klar, dass selbst so „harmlose“ Substanzen wie Kochsalzlösung eine peritoneale Reaktion hervorrufen. [13] [51] [87] Die Klinik einer dialyseinduzierten Serositis variiert sehr stark: Neben asymptomatischen Patienten reichen die angegebenen Beschwerden von abdominellen Schmerzen und Unwohlsein bis hin zu Juckreiz und lokalem oder generalisiertem Hautausschlag. Der gebräuchlichste Indikator für eine peritoneale Irritation ist Fibrin im Effluat, manchmal begleitet von erhöhter Zellzahl bis hin zur Trübung.

Als Auslöser für diese Serositis werden seit der Anfangszeit der PD Bestandteile der Lösungen und Spuren unvermeidlicher Kontaminationen angeschuldigt. Suspekte Agenzien können grob als chemische Irritatoren, Partikel oder Allergene kategorisiert werden. [36] Um die genaue Pathogenese aufzuklären, fehlen hier sicher noch Untersuchungen im Tiermodell, da die vorliegenden in vitro-Untersuchungen immer an Zellen unternommen werden, die vorher noch nie PD-Lösungen ausgesetzt waren und auch keine urämischen Episoden durchlaufen haben. In sofern sind die Adaptationsmechanismen von Zellen, die wiederkehrend mit den unphysiologischen Dialyselösungen in Kontakt kommen, in vitro nicht zu klären, und es kann nur eine Aussage über Toxizität oder Subtoxizität gemacht werden. [16]

So erhöht beispielsweise Glucose (die sich in großen Mengen in der Dialyselösung befindet) die Synthese von TGF β in MC, was vermutlich zur peritonealen Fibrose prädisponiert. [103] Auch die bei der Hitzesterilisation entstehenden Glucosedegradationsprodukte haben zytotoxische Wirkung. [151]

In Zusammenhang mit der PD wird ebenso die eosinophile Serositis gebracht: In einer Longitudinalstudie an Patienten, bei denen erstmalig eine PD durchgeführt wurde, entwickelten 61% im Laufe von 7 Monaten Therapiedauer eine Eosinophilenzellzahl von über $100/\text{mm}^3$ im Dialysat als diagnostisches Kriterium. Im Vergleich mit den Patienten, die keine eosinophile Serositis entwickelten, hatten die Patienten sowohl initial, als auch über die gesamte Beobachtungsperiode ein erhöhtes Serum-IgE. [22] Dobbie sieht den Eosinophilenanstieg im Dialysat als Indikator einer Hypersensitivitätsreaktion, wobei beschrieben wird, dass im Tierversuch jede in die Peritonealhöhle eingebrachte Flüssigkeit die Eosinophilenzahl erhöhen kann und dass diese Erscheinung v.a. bei Hasen sehr verbreitet sei. [36]

Auch eine Fremdkörperserositis kann als Folge der PD-Behandlung auftreten: Der in der Peritonealhöhle verbleibende Katheter und repetitive Infusionen aus Plastikbeuteln über ein Schlauchsystem aus Plastik sind Quellen unvermeidlicher Fremdstoffe, die in den Abdominalraum eingespült werden. Das Spektrum reicht hier von Zellulosefasern, die sich aus dem Plastikmaterial abscheren, bis hin zu aus dem Plastik herausgelösten Stoffen wie Calciumstearat, Weichmacher und Epoxidöl. [36]

2.4.5 Peritoneale Fibrosierungssyndrome unter PD und ihre Folgen

In den vorhergehenden Kapiteln wurden Pathogenese und mögliche Auslöser von peritonealen Fibrosierungsreaktionen erörtert. In diesem Kapitel möchte ich mich mit den Ausprägungsgraden peritonealer Fibrosierungen speziell unter PD und deren Folgen für die Anwendbarkeit dieses Dialyseverfahrens befassen.

Während sich im 19. Jahrhundert die Chirurgen ausschließlich mit dem Problem der lokal begrenzten fibrösen Adhäsionen konfrontiert sahen, trat mit der Entwicklung der PD eine neue Form der iatrogenen Fibrose auf, die sowohl hinsichtlich der Aggressivität ihrer Fibrozytogenese als auch hinsichtlich ihrer globalen Ausprägung im Peritoneum bemerkenswert ist. [35] Dobbie beschreibt hinsichtlich makroskopischer und histologischer Kriterien vier verschiedene Ausprägungsgrade:

Als niedrigste Stufe gibt er die „peritoneale Trübung“ (peritoneal opacification) an, die vor allem makroskopisch beschrieben wird und unter Umständen eine lokale Akzentuierung in der Gegend des distalen Katheterendes, im kleinen Becken und den parakolischen Rinnen aufweist. In diesem Zusammenhang wird auf die mikroskopische Beobachtung der Desorganisation normaler Kollagenfasern und der Expansion der ECM verwiesen. [34] In einer systematischen Analyse peritonealer Biopsien konnte gezeigt werden, daß die mittlere Dicke der submesothelialen Kollagenzone mit der Zeit an der PD korreliert und nach fünf Jahren Therapie mehr als das dreifache gegenüber Normalpersonen beträgt. [89]

Schwerere Fälle der Fibrose nennt Dobbie „tanned [gebräuntes] peritoneum“. Makroskopisch ist das gesamte viszerale und parietale Peritoneum trocken, verrunzelt und von hellbrauner Farbe. Es ist verdickt und weist eine ledrige Konsistenz auf. Mikroskopisch zeigt sich, dass die äußere Schicht des Peritoneums durch ein azelluläres Band hyalinisierter Kollagenfasern ersetzt ist. (Dobbie verwendet hier den Begriff der „cellular desert“). Das Mesothel fehlt. Unter Umständen findet sich eine spärliche Infiltration mit mononukleären

Zellen in den unteren Gewebsschichten. Stromale Gefäße zeigen für gewöhnlich deutliche sklerotische Veränderungen. [35] Nach Mactier sind diese beiden fibrotischen Veränderungen [opalescent und tanned peritoneum] abhängig von der zeitlichen Dauer der PD-Behandlung. Ebenso treten sie vermehrt bei Patienten auf, die wiederholte Episoden schwerer Peritonitiden erlitten haben. Funktionell wirken sich diese Fibrosierungen zum einen durch eine vermehrte peritoneale Transportrate und zum anderen durch einen Verlust der peritonealen Ultrafiltrationskapazität aus. Dies führt dazu, dass die PD bei mehr als 50% der Patienten nach fünf Jahren nicht mehr angewendet werden kann. [47]

Eine Sonderform der peritonealen Fibrosierung ist die murale Fibrose: Hier entwickelt sich die Fibrose nicht nur in den oberflächlichen Schichten des Peritoneums, sondern infiltriert auch die longitudinale Muskulatur der Darmwand. Makroskopisch gleicht das Peritoneum dem „tanned peritoneum“, jedoch ist der Darm versteift und erscheint verdickt. Auf histologischer Ebene ist keine klare Verdickung des Peritoneums festzustellen, und die Steifheit rührt vermutlich vom fibrotischen Umbau der äußeren Darmwand her. Klinisch präsentieren sich die Patienten mit Darmpassagestörungen, Adhäsionen fehlen jedoch meist. [35]

Die schwerste Form der peritonealen Fibrose stellt die sklerosierende einkapselnde Peritonitis (SEP) [sclerosing encapsulating peritonitis] dar. Dobbie beklagt, dass dieser Begriff in der Literatur oft für jede Form der peritonealen Verdickung benutzt wird. Im Gegensatz dazu definiert er dieses Krankheitsbild als

- a) progressive Bildung dichten kollagenen Gewebes [sclerosing]
- b) Einmauerung des Dünndarms von Schichten neuen fibrösen Gewebes [encapsulating]
- c) Mononukleäres entzündliches Infiltrat [Peritonitis] [35]

SEP-Patienten präsentieren sich oft mit Symptomen, die durch partiellen oder intermittierenden Darmverschluss verursacht sind: Übelkeit und Erbrechen,

abdominelle Schmerzen und Mangelernährung. Ebenso kann ein Verlust der Ultrafiltrationskapazität auftreten, oder beide Symptomenkomplexe zusammen. [89]

In einem australischen Patientenkollektiv zeigte sich eine starke Korrelation mit der Dauer an der PD: Nach zwei Jahren hatten 2%, nach fünf Jahren 6%, nach sechs Jahren 11% und nach acht Jahren 19% der PD-Patienten eine SEP entwickelt. Die Mortalitätsrate betrug 56%! [125]

Als Therapieoptionen bei SEP gibt Mactier die Beendigung der PD-Behandlung sowie, wenn erforderlich, künstliche Ernährung und chirurgische Interventionen bei Darmverschluss an. Eine immunsuppressive Therapie kann die Mortalitätsrate eventuell senken. [89]

Da alle Langzeit-PD-Patienten eine peritoneale Fibrose in variabler Ausprägung entwickeln [89] und eine Reduktion der PAA in diesem Prozess eine Rolle spielt (siehe 2.4.1), muss für die Prävention von peritonealen Fibrosierungen unter anderem die Aufrechterhaltung des intraperitonealen Fibrinolysegleichgewichts unter PD angestrebt werden. In diesem Kontext untersucht die vorliegende Arbeit die Wirkung von HA auf die mesotheliale Produktion von t-PA und PAI-1.

2.5 Hyaluronan

2.5.1 Die Struktur von Hyaluronan

Hyaluronan (HA), auch Hyaluronsäure genannt, ist ein hochmolekulares lineares Polysaccharid, dessen Grundgerüst abwechselnd aus N-Acetyl-D-Glukosamin- und D-Glukuronsäure-Molekülen besteht, die über $\beta(1\rightarrow4)$ und $\beta(1\rightarrow3)$ -glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die Moleküle bilden in Lösung stark hydratisierte, zufällig geknickte Spiralen, die sich schon bei Konzentrationen unter 1 mg/mL verwinden. [81] Diese Tatsache macht sich durch die zunehmende Viskosität bei steigenden Konzentrationen bemerkbar. [100] Wenn sich die Ketten verwickeln, bilden sie streckenweise auch Doppelhelices aus, so dass das entstandene Netzwerk mechanisch noch stabiler wird. [129]

HA-Lösungen sind viscoelastisch, die Viskosität ist scherungsabhängig. Bei hohem Scherungsgrad kann die Viskosität um den Faktor 1000 abfallen. [100] [49] [14] Über dem Verwicklungspunkt steigt die Viskosität exponentiell mit der Konzentration ($\approx c^{3,3}$). [100] Die Elastizität des Systems steigt mit wachsendem Molekulargewicht und wachsender HA-Konzentration. [81] Diese rheologischen Eigenschaften von HA werden immer dort im Körper ausgenutzt, wo sich Oberflächen gegeneinander bewegen, z.B. bei Knorpeloberflächen in Gelenken [80] oder auch in der Peritonealhöhle. Als Polysaccharid-Netzwerk bindet HA eine große Menge an Flüssigkeit. Auf diesem Wege verhindert HA exzessive Flüssigkeitsbewegungen durch Gewebekompartimente hindurch. Darüber hinaus steigt der osmotische Druck einer HA-Lösung exponentiell mit der Konzentration. Dieses exponentielle Verhältnis macht HA zu einem exzellenten osmotischen Puffer: Geringe Konzentrationsänderungen führen zu deutlichen Änderungen im osmotischen Druck. Die Fähigkeit, Flüssigkeit zu speichern, zusammen mit der Eigenschaft als osmotischer Puffer machen HA zu einem idealen Regulator der Wasserhomöostase im Körper. [81]

HA verlangsamt die Diffusion anderer Moleküle, [27] wobei gezeigt werden kann, dass es sich hierbei um eine sterische Hinderung der Molekülbewegung handelt und nicht um einen Viskositätseffekt der Lösung. Je größer ein Molekül ist, desto mehr wird es an seiner Bewegung gehindert. In vivo agiert HA deshalb als Diffusionsbarriere und reguliert den Transport anderer Substanzen durch die Interzellulärspalten. [81] Darüber hinaus entzieht das HA-Netzwerk anderen Molekülen ein gewisses Volumen des Lösungsmittels: Je größer ein Molekül ist, desto weniger Raum steht ihm damit zur Verfügung. [27] Eine Lösung von 10g/L HA entzieht Serumalbumin beispielsweise die Hälfte seines Lösungsmittels. [81]

Seit den 1940er Jahren ist bekannt, dass HA durch verschiedene oxidative Systeme und ionisierende Strahlung abgebaut wird. Der gemeinsame Nenner hierfür ist eine Kettenspaltung – induziert durch freie Radikale (im wesentlichen Hydroxy-Radikale). Durch diese Reaktion agiert HA als effektiver Radikalfänger, wobei die Bedeutung in biologischen Systemen noch unklar ist. [81]

2.5.2 Hyaluronsäure und Mesothelzellen

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Wirkung von HA auf die Produktion von mesothelialen Fibrinolysefaktoren (t-PA und PAI-1) in MC. Aus diesem Grund möchte ich einen kurzen Überblick über die Interaktionen von MC und HA, v.a. vor dem klinischen Hintergrund der PD, geben.

MC synthetisieren selbst HA in nicht unerheblichen Mengen. Dazu besitzen sie drei Isoformen einer Hyaluronansynthase, die differenziert reguliert werden und besonders in subkonfluenten Zellen stark exprimiert sind. Die Expression der HA-Synthetasen korreliert in MC-Kulturen gut mit der produzierten HA-Menge. Verschiedene Stimuli wie platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), TGF β 1 und fetales Kalbsserum (FCS) führen zur vermehrten Produktion von

hochmolekularem HA (MW > 2 x 10⁶ Da), wohingegen der Proteinkinase-C-Aktivator PMA die verstärkte Produktion von HA polydisparger Größe bedingt. Hydrocortison vermindert die HA-Produktion in MC. [73] Ebenso lässt sich in MC die HA-Synthese durch eine erhöhte N-Acetyl-Glucosamin (NAG)-Konzentration im Medium steigern, welches dann als Substrat für die Synthese von Glycosaminoglykanen in größerer Menge zur Verfügung steht. [15] Es wird außerdem beschrieben, dass insbesondere das Zytokin IL-1 β die HA-Synthese in MC steigert. [154]

Auch die Inkubation mit Dialyseeffluat von PD-Patienten steigert die mesotheliale HA-Sekretion, insbesondere, wenn das Effluat von Patienten stammt, die gerade eine peritonitische Episode erleiden. Dieser inflammatorisch bedingte Anstieg kann durch die Koinkubation der Zellen mit einem IL-1 β -Rezeptorblocker unterbunden werden, während die geringer erhöhte HA-Synthese durch Inkubation mit dem Effluat nichtperitonitischer Patienten von diesem Antagonisten unbeeinflusst bleibt. Die Inkubation mit frischer PD-Lösung hat auf die HA-Produktion in MC überhaupt keine Auswirkung. Yung et al. ziehen daraus den Schluss, dass IL-1 β die Ursache für die vermehrte HA-Synthese durch peritonitisches Effluat ist. [154]

Für die Bedeutung von HA für MC gibt es mehrere Konzepte: Anhand von in vitro Studien wurde HA als eine entscheidende Komponente der Glykokalix von Zellen identifiziert. Diese schützt die Zellen vor viralen Infektionen [23] und dem zytotoxischen Effekt von Lymphozyten. [45] [94] Heldin und Pertoft beschrieben, dass das neu synthetisierte HA eine Hülle um die MC bildet. [62]

MC besitzen aber auch einen membranständigen Rezeptor für HA: CD 44, das in hoher Dichte auf MC exprimiert wird. [126] Dieser Rezeptor besteht aus einer Transmembrandomäne sowie drei HA-Bindungsstellen (zwei extrazellulär und eine im cytoplasmatischen Ende). [105] Das HA-CD44-Signal ist in der Lage, verschiedenste intrazelluläre Signaltransduktionswege zu aktivieren, wie z.B. Rho- und Rac1-GTPasen, die erbB2 Tyrosinkinase (durch CD44-erbB2-

Heterodimerisation), src-related Tyrosinkinasen und NF- κ B. [84] Hauptfunktionen für den CD44-HA-Rezeptor werden in der HA-vermittelten Zellmigration und im Tumorwachstum gesehen, wobei es hierzu bisher allerdings ziemlich kontroverse Ergebnisse gibt. [105]

HA ist in der Lage, die Chemokinsynthese von MCP-1 und IL-8 in MC zu stimulieren. Dieser Effekt ist abhängig von der Molekülgröße des HA und tritt nur bei HA-Fragmenten eines MGs von 1×10^5 bis 7×10^5 Da auf. Diese beiden Chemokine spielen bei der Einwanderung von Monozyten oder Neutrophilen in entzündetes Gewebe eine Rolle. [59]

2.5.3 Hyaluronsäure und Peritonealdialyse

Wie bereits beschrieben, produzieren MC (neben Fibroblasten) größere Mengen an HA. Bei PD-Patienten steigt die HA-Konzentration im Dialyseeffluat während peritonitischer Episoden und mit der Zeit an der PD an. [153] Wie oben beschrieben, wird vermutet, dass HA eine Hülle um MC bildet, welche die Zellen vor Schädigungen bewahrt. Da HA allerdings sehr leicht von der peritonealen Oberfläche abgewaschen werden kann, wird vermutet, dass die PD-Behandlung die schützende HA-Schicht entfernt. [55] Daher wurden Überlegungen angestellt, HA der Dialyseflüssigkeit zuzufügen. Guo et al. zeigten, dass die i.p. HA-Gabe die peritoneale Flüssigkeitsabsorptionsrate vermindern konnte. [55] Auch Polubinska et al. fanden im Tierversuch nach Zugabe von HA zur Dialyseflüssigkeit (Dianeal, 3,86% Glukose) in einer Konzentration von 10 mg/dL ein signifikant erhöhtes intraperitoneales Volumen nach vier Wochen Versuchsdauer. [118] Diese erhöhte Ultrafiltration wird auf eine verminderte hydraulische Leitfähigkeit des peritonealen Interstitiums zurückgeführt, die zwar die Reabsorption des Wassers in die Mikrogefäße vermindert, den Wasserfluss in die Peritonealhöhle durch den glukoseinduzierten osmotischen Gradienten aber nicht beeinflusst. Diese

verbesserte Ultrafiltration könnte sogar noch eine Zeit anhalten, wenn HA der Dialyseflüssigkeit wieder entzogen wird, da die Konzentration von HA (im Tierversuch) im Gewebe um 48% anstieg. [118] Eine andere Arbeit zeigt, dass im Tiermodell bis zu 25% des i.p. gegebenen HA (10mg/dL in Dianeal, 3,86% Glucose) nach 8 Stunden aus der Peritonealhöhle absorbiert werden und im Vergleich zur Kontrolle HA in signifikant höheren Konzentrationen im Peritoneum vorliegt. Diese Absorption verursacht auch eine erhöhte HA-Plasmakonzentration, wobei das Maximum nach 12 Stunden erreicht ist und auf Grund des schnellen turnovers innerhalb von 24 Stunden wieder im Bereich des Ausgangswertes liegt. [20] Auch beim Menschen ist die Plasmahalbwertszeit von injiziertem HA mit 2,5 bis 5,5 Minuten angegeben, wobei HA extrarenal eliminiert wird. [45]

Polubinska fand aber nicht nur eine HA-induzierte Verbesserung der Ultrafiltration, sondern auch eine signifikant verminderte Permeabilität sowohl für Albumin als auch für das Gesamteiweiß. Eine im Gegensatz dazu erhöhte Clearance der kleinen Moleküle (Kreatinin und Harnstoff) durch HA wurde zwar tendenziell gesehen, war aber nicht signifikant. Dies zeigt aber, dass die reduzierte Proteinkonzentration zumindest nicht ausschließlich ein Verdünnungseffekt ist. Die beschriebene Verminderung des Proteinverlustes über die peritoneale Membran wird durch die negative Ladung des Glykosaminoglykans HA erklärt. Der gleiche Mechanismus (negativ geladene Glykosaminoglykane) führt bei der glomerulären Basalmembran zu einem verminderten Proteintransport. [118] Auch beim Menschen zeigt sich eine Verminderung des peritonealen Proteinverlusts durch Anwendung einer Heparan- und Dermatansulfat enthaltenden PD-Lösung. [6] Ebenso kommt es bei der oben erwähnten Arbeit [118] zu einer Veränderung inflammatorischer Marker nach vier Wochen PD mit Dialyseflüssigkeit, der HA beigefügt wurde: Die mit HA behandelten Tiere hatten trotz gleicher peritonealer Zellzahlen einen signifikant geringeren Anteil neutrophiler Granulozyten als die Kontrolltiere.

Auch waren die proinflammatorischen Zytokine MCP-1 und TNF α im Dialysat in signifikant niedrigerer Konzentration enthalten. Die Autoren ziehen daraus den Schluss, dass exogen zugeführtes HA die peritoneale Entzündung oder Leukozytenaktivierung, die mit der Exposition gegenüber Dialyselösungen in diesem Modell assoziiert ist, vermindert. [118]

Im Gegensatz dazu steht eine andere Arbeit derselben Arbeitsgruppe, die im gleichen Tiermodell unter LPS-induzierter Peritonitis keine Änderung der inflammatorischen Antwort hinsichtlich Zellzahl und Zytokinproduktion unter HA-Zugabe zum Dialysat finden. Darüber hinaus wurden erhöhte IFN γ -Konzentrationen (die möglicherweise eine Rolle für die peritoneale Immunantwort spielen) und eine verminderte Elastaseaktivität (Elastase wird im Zusammenhang mit der Schädigung der peritonealen Membran gesehen) gefunden. Eine bessere Ultrafiltrationsleistung unter HA trat aber auch hier auf. [19]

3. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorhergehenden Abschnitten ausführlich erläutert, führt die Nierenersatztherapie mittels PD zu schweren Schädigungen an der peritonealen Membran, die sich nicht nur negativ auf das Methodenüberleben auswirken, sondern unter Umständen auch die betroffenen Patienten vital bedrohen. Das lokal-fibrinolytische System der Peritonealhöhle - in dessen Regulation Mesothelzellen eine Schlüsselrolle spielen - nimmt in der Pathogenese von vielen dieser Veränderungen eine entscheidende Stellung ein. In den letzten Jahren wurde in mehreren Studien immer wieder der positive Einfluß von Hyaluronan sowohl hinsichtlich positiver Auswirkungen auf die Dialysemodalitäten als auch hinsichtlich der Verminderung von peritonealen Adhäsionen diskutiert. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen von Hyaluronan auf mesothelial synthetisierte Komponenten des lokal-fibrinolytischen Systems zu untersuchen. Im einzelnen wurden dazu folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welchen Einfluß hat Hyaluronan auf die Produktion von t-PA und PAI-I in MC in Abhängigkeit von HA-Konzentration und Inkubationszeit?
- Lassen sich Veränderungen des t-PA, bzw. PAI-1 Antigens auch auf transkriptioneller Ebene nachweisen?
- Sind an den evtl. Veränderungen typische Signaltransduktionswege beteiligt?

Die Experimente wurden an Kulturen humaner peritonealer Mesothelzellen durchgeführt, die mittels enzymatischer Disaggregation aus Operationspräparaten des großen Netzes gewonnen wurden. Für die Bestimmung der mesothelialen t-PA und PAI-I Synthese auf Proteinebene

Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

wurde die ELISA-Technik angewandt. Die Transkription wurde mittels Northern Blot-Analyse untersucht.

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Materialien zur Zellkultur

Herkunft

Nährmedium

Medium M199	Gibo BRL, Eggenstein
10% Humanserum	Blutspendedienst München
10% Neugeborenen Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin 10 U/ml	Boehringer, Mannheim
Streptomycin 0,01 U/ml	Boehringer, Mannheim
Heparin 50 µg/ml	Gibco BRL, Eggenstein
Endothelialer Wachstumsfaktor (ECGF) 25 µg/ml	Boehringer, Mannheim

Pufferlösung

PBS (mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)	Gibco BRL, Eggenstein
---	-----------------------

Monoklonale Antikörper

Gegen Zytokeratin-8 und -18, gegen Vimentin und gegen Willebrandt- Faktor	Dr. G. van Muijen (Universität Nijmegen, Niederlande)
Fluorescein Isothiozyanat markierte Anti-Maus-AK	Dianova, Hamburg
Anti-CD-44-AK BU75	Ancell Corporation, Bayport, USA

Chemikalien und Reagenzien

Trypsin-EDTA	Boehringer, Mannheim
Collagenase Typ II	Worthington, New Jersey
Fibronektin	Boehringer, Mannheim
Hyaluronan	1. ICN, Aurora, Ohio, USA 2. Genzyme, Cambridge, MA, USA
PD 98059	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden,
SB 203580	Alexis Biochemicals, Grünberg

4.1.2 Materialien zur Northern Blot-Analyse

Herkunft

Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Deionisiertes Formamid	Sigma, Deisenhofen
Dietehylether	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
EDTA disodium salt	Gibco BRL, Eggenstein
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung mind. 37%	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Guanidin-HCl	Gibco BRL, Eggenstein
MOPS	Sigma, Deisenhofen
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat (wasserfreies)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Phenol (buffer-saturated)	Gibco BRL, Eggenstein
Tris Hydrochlorid	Gibco BRL, Eggenstein

4.2 Methoden

4.2.1 Mesothelzellkultur

4.2.1.1 Präparation und Kulturbedingungen

Humane peritoneale Mesothelzellen (MC) wurden durch enzymatische Diasaggregation in Anlehnung an die von Stylianou et al. [136] beschriebene Methode aus Operationspräparaten des großen Netzes gewonnen. Alle Präparate wurden im Rahmen von Elektiveingriffen gewonnen und Material von Patienten mit Peritonitis oder Peritonealkarzinose verworfen. Nach bis zu 24stündiger Aufbewahrung des Omentums in sterilem Puffermedium bei 4°C und nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung der Erythrozyten, wurde das Präparat in 1 mm² große Stücke geschnitten und in einer sterilen Kollagenaselösung (1 mg Kollagenase/ml Medium M199) bei 37°C inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Gewebestückchen aus der Kollagenaselösung entnommen, in frischem Medium M199 nochmals gewaschen (um noch anhaftende Zellen zu lösen) und anschließend verworfen. Die Kollagenaselösung und das Waschmedium wurden vermischt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und in eine mit Fibronektin beschichtete Kulturflasche überführt. Im Inkubator bildeten die Zellen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre nach fünf bis acht Tagen einen dichten adhärenen Monolayer. Alle 48 Stunden wurde das Nährmedium gewechselt.

Abbildung 3 zeigt eine konfluente MC-Primärkultur

4.2.1.2 Charakterisierung der Mesothelzellen

Zur Überprüfung der Kulturen wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen nach morphologischen und immunologischen Kriterien charakterisiert:

Nachdem die Zellen in Form eines kontaktinhibierten Monolayers bis zur Konfluenz gewachsen waren, zeigten sie im Phasenkontrastmikroskop das typische Pflastersteinmuster. Die polygonalen, ca. 30-50 μm großen Zellen sind scharf voneinander abgegrenzt. Die großen, mittelständigen Kerne weisen einen oder mehrere Nukleoli auf und bei vielen Zellen sind perinukleäre Granula sichtbar (s. Abb. 3)

Für die Immunfluoreszenz wurden monoklonale Maus-Antikörper gegen Zytokeratin-8 und -18 verwendet und anschließend die Bindungsreaktion mit Fluorescein Isothiozyanat markierten Anti-Maus-Antikörpern unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Durch den Nachweis dieser mesothelzelltypischen Zytokeratine wurden Mesothelzellen vor allem von Endothelzellen unterschieden, [144] die morphologisch sehr ähnlich aussehen. Abbildung 4 zeigt Zellen, deren Zytoskelett mit Antikörpern gegen Zytokeratin-8 markiert wurden. In der Gegenprobe, die mit Antikörpern gegen den Willebrandt-Faktor, einen Endothelzellmarker, durchgeführt wurde, ließen sich keine Zellen anfärben.

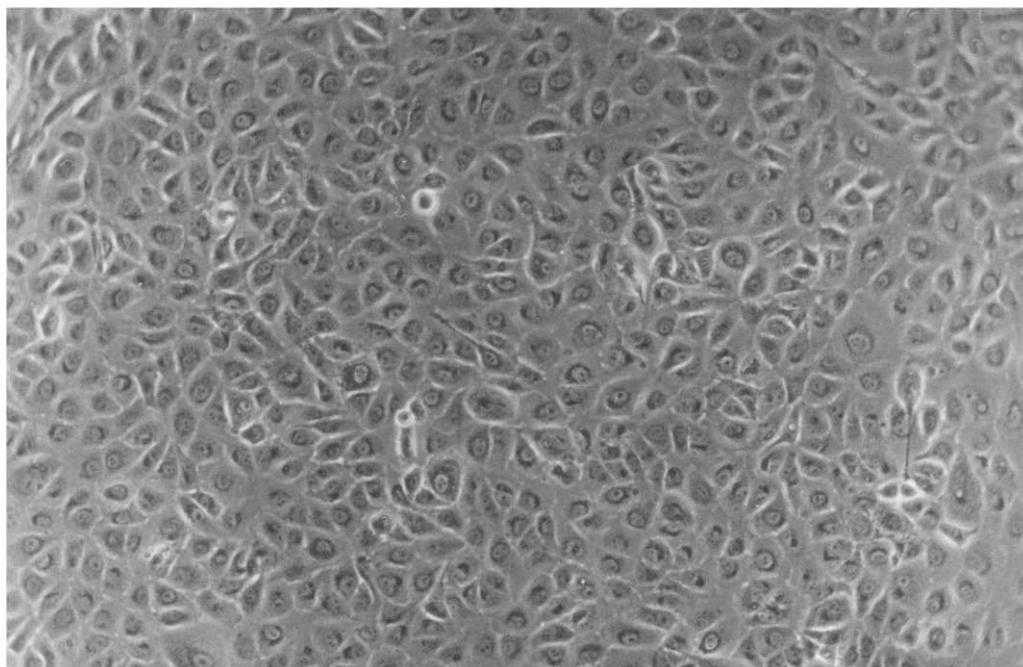


Abb. 3: konfluente MC-Primärkultur (Vergrößerung x 100)



Abb. 4: Positiver Nachweis von Zytokeratin-8 in der Fluoreszenzmikroskopie

4.2.1.3 Passage in Kulturgefäßen und Vorbereitung für die Experimente

Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurden 0,5 ml 0,1% Trypsin-EDTA-Lösung auf 10 cm² konfluente Kulturen gegeben. Die Ablösung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle und dauerte etwa 1 bis 2 Minuten. Durch Zugabe von Nährmedium, das aufgrund seiner Serumbestandteile Antitrypsin enthält, wurde die Reaktion gestoppt. Die gewonnene Zellsuspension wurde auf neue, mit Fibronectin beschichtete Kulturgefäße aufgeteilt, wobei das Teilungsverhältnis dabei ca. 4 bis 6 betrug.

Für die Experimente wurden konfluente Kulturen nach der zweiten oder dritten Passage verwendet. Konfluente Monolayer zeigten eine Zelldichte von ca. 5×10^4 Zellen/cm², wie es durch Auszählen abgelöster Zellen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde. 24 Stunden vor Beginn eines Experiments wurden die Zellen mit 2% Humanserum enthaltendem Medium M199 inkubiert, um durch eine niedrige Serumkonzentration eine Vorstimulation der Zellen durch Serumbestandteile gering zu halten.

4.3 Analyse der Antigen-Produktion von t-PA und PAI-1 in MC

4.3.1 Messung der t-PA Synthese in MC mittels ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der t-PA-Konzentration wurde ein COALIZA t-PA ELISA-Kit der Firma Chromogenix, Schweden, verwendet. Dieser Test ist nach dem Sandwichprinzip aufgebaut: Die Mikrotiterplatten sind mit einer Mischung aus monoklonalen anti-t-PA-AK beschichtet, die das in der Probe enthaltene humane t-PA binden. Nach einem Waschschrift bindet in einem zweiten Reaktionsschritt ein enzymmarkierter monoklonaler anti-t-PA-AK (Konjugat) an die sich in den Mikrotiterplatten befindlichen Antikörper-Antigen-Komplexe. Überschüssiges Konjugat wird durch einen erneuten Waschschrift entfernt. Die Interaktion zwischen dem am Konjugatantikörper

gebundenen Enzym (Meerrettichperoxidase) und dem Substrat (Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid gelöst) lässt eine Blaufärbung entstehen, welche sich nach Abstoppen der Reaktion mit 1M Schwefelsäure in Gelb verwandelt. Die Intensität der Farbe wurde in einem Microplate Reader der Firma Dynatech Laboratories, Deutschland, bei 450 nm gemessen. Das Ausmaß der Farbentwicklung ist dem t-PA-Gehalt in der Probe proportional. Um den t-PA-Gehalt der Probe quantitativ zu bestimmen, wurde mit denen im Kit beigefügten Standardlösungen eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe sich dem jeweiligen OD-Wert eine Konzentration zuordnen ließ.

4.3.2 Messung der PAI-1 Synthese in MC mittels ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der PAI-1-Konzentration wurde ein COALIZA PAI-1 ELISA-Kit der Firma Chromogenix, Schweden, verwendet. Dieser Test ist ebenfalls nach dem Sandwichprinzip aufgebaut: Die Mikrotiterplatten sind mit monoklonalen anti-PAI-1-AK beschichtet, die das in der Probe enthaltene humane PAI-1 binden. Nach einem Waschschrift bindet in einem zweiten Reaktionsschritt ein enzymmarkierter monoklonaler anti-PAI-1-AK (Konjugat) an die sich in den Mikrotiterplatten befindlichen Antikörper-Antigen-Komplexe. Überschüssiges Konjugat wird durch einen erneuten Waschschrift entfernt. Die Interaktion zwischen dem am Konjugatantikörper gebundenen Enzym (Meerrettichperoxidase) und dem Substrat (Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid gelöst) lässt eine Blaufärbung entstehen, welche sich nach Abstoppen der Reaktion mit 1M Schwefelsäure in Gelb verwandelt. Die Intensität der Farbe wurde in einem Microplate Reader der Firma Dynatech Laboratories, Deutschland, bei 450 nm gemessen. Das Ausmaß der Farbentwicklung ist dem PAI-1-Gehalt in der Probe proportional. Um den PAI-1-Gehalt der Probe quantitativ zu bestimmen, wurde mit denen im Kit

Materialien und Methoden

beigefügten Standardlösungen eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe sich dem jeweiligen OD-Wert eine Konzentration zuordnen ließ.

4.4 Northern Blot Analyse

4.4.1 Präparation der Gesamt-RNA

Um den Effekt von HA auf die t-PA und PAI-1 mRNA-Expression zu untersuchen, wurde die Northern Blot Analyse verwendet. Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA der Zellen präpariert, wozu pro Bedingung 3×10^6 Zellen mit dem entsprechenden Stimulus inkubiert wurden.

Nach Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von je 2 ml Guanidin-HCl-Lösung - bestehend aus 71,6 g Guanidin-HCl, 735 mg Natriumcitrat und 100 mg N-Laurylsarcosin auf 100 ml Wasser – lysiert. Die Lysate wurden anschließend mit Hilfe von Einwegspritzen 4-5 mal durch eine 27G-Kanüle gepresst, wodurch Scherkräfte zur besseren Aufschlüsselung einwirken konnten. Nach Zugabe von 0,5 Volumenanteil Ethanol 100% (750 μ l) und sorgfältigem Vortexen, wurden die Proben zur Fällung bei -20°C für 30-36 Stunden aufbewahrt. Die darauffolgende Zentrifugation für 15 Minuten bei 10000 rpm und 4°C ermöglichte ein Dekantieren des Überstandes und das Überführen des Pellets in 300 μ l PK-Lösung. Die PK-Lösung setzt sich aus 5 ml 1M Tris-HCl, 0,5M NaCl, 1 ml 0,5M EDTA, 0,5 ml 20% SDS und 10 ml 3M Natriumacetat auf 100 ml Wasser zusammen. Bei der nachfolgenden Phenolextraktion wurden jeder Probe 300 μ l Phenol zugegeben und nach Vortexen und Zentrifugation (3 Minuten, 14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand zur Weiterverarbeitung abgenommen. Es folgte ein Reinigungsschritt mit Diethylether, der in einem Volumen von 1 ml zugegeben wurde. Nach Vortexen und Zentrifugation wurde der Etherüberstand mit einem Vakuumsauger entfernt. Anschließend wurden 750 μ l Ethanol 100% zugesetzt und die Proben zur Fällung für 24 Stunden bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 14000 rpm, 4°C) und Absaugen des Überstandes konnte das Pellet in 100 μ l DEPC-Wasser resuspendiert werden. In eine Verdünnung von 1:100 der

entstandenen Lösung wurde die RNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

4.4.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Um die mRNA aus der präparierten Gesamt-RNA zu trennen, wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein Agarose-Gel hergestellt: 6 ml 1M MOPS-Lösung, 0,3 ml 0,5M EDTA-Lösung und 0,6 ml 2,5M Natriumacetatlösung wurden zu 23 ml Wasser gegeben und zusammen mit 1,5 g Agarose und 93 ml Wasser aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 27 ml Formaldehyd wurde der Ansatz in einer Elektrophoresegekkammer (BioRad, München) zu einem Gel gegossen.

Zur Probenanalyse wurden je 10 µg RNA mittels eines Speedvacs (Schubert, München) getrocknet und in 15 µl Ladepuffer, bestehend aus 2,7 µl DEPC-Wasser, 1,2 µl MOPS-Lösung, 2,1 µl Formaldehyd, 6,0 µl Formamid, 3,0 µl Northern Blue Juice und 0,625 µl Ethidiumbromid, aufgenommen. Nach Inkubation der Proben für 15 Minuten bei 65°C wurden diese auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese lief in der mit 1,5 l Laufpuffer (0,3 l MOPS-Lösung in 1,2 l Wasser) gefüllten Kammer bei ca. 1,5 V/mA für ca. 3-4 Stunden. Unmittelbar nach Beendigung des Laufes wurde von dem Gel unter UV-Licht ein Polaroidphoto angefertigt, um die gleichmäßige RNA-Auftrennung zu kontrollieren.

4.4.3 Blotten der elektrophoretisch aufgetrennten RNA

Das Blotten – die Übertragung der RNA auf eine Nitrozellulosemembran - erfolgte auf eine Hybond-N-Membran (Fa. Amersham, Buckinghamshire, UK) mit der Transferlösung 20 x SSC (Salt Sodiumcitrate), bestehend aus 175,2 g

Natriumchlorid und 88,2 g Natritumcitrat auf 1 l Wasser. Anschließend wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (UV Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

4.4.4 cDNA-Fragmente, Hybridisierung und Phosphor-Imager

Zur Markierung der jeweiligen mRNA kamen die folgenden cDNA-Fragmente zum Einsatz: ein 1,9 kb Bgl II Fragment humaner t-PA cDNA, [145] ein 2,5 kb EcoRI Fragment humaner PAI-1 cDNA des 3,1 kb-Transkripts, [143] ein 6 kb XhoI/FcoRI Fragment der humanen low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) cDNA [65] und ein 1,2 kb PstI Fragment von Ratten-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) cDNA, das von Dr. R. Offringa (Universität von Leiden, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde.

Die folgenden Schritte wurden mit Hilfe von Frau Dr. B. Löffler im TNO Prevention and Health Institut in Leiden (Niederlande) durchgeführt.

Die Detektion der mRNA erfolgte mittels radioaktiv markierter Sonden. Zur Herstellung dieser Sonden wurde das random priming Verfahren verwendet, wobei die cDNA als Template (Matrize) diente und die Markierung mit α -³²-Phosphor dCTPs erfolgte. Die Aktivität der Sonde betrug ca. 2×10^8 cpm/ μ g und wurde in einer Konzentration von 1 ng/mL zur Hybridisierung bei 63°C eingesetzt.

Nach abgeschlossenem Hybridisierungsvorgang und mehrmaligem (3-mal) Waschen der Membran, wurde diese auf einen Amersham Hyperfilm-MP gelegt. Es folgte eine Exposition über Nacht.

Die Auswertung des Filmes erfolgte dann mittels einem Fujix Bas 1000 Phosphorimager.

4.5 Statistische Auswertung

Alle Werte aus Mehrfachbestimmungen ($n \geq 3$) sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Vergleiche zwischen Gruppen verbundener Größen wurden mit dem NP-Wilcoxon Signed Rank-Test durchgeführt. Bei Vergleichen von Gruppen unzusammenhängender Größen kam der NP-Whitney-Test zum Einsatz. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant betrachtet.

5. Ergebnisse

5.1 Untersuchung der Auswirkung von HA auf die Synthese mesothelialer Fibrinolysefaktoren

5.1.1 Die Auswirkung von hochmolekularem Hyaluronan auf die t-PA Synthese in MC

Gegenstand der Arbeit war unter anderem, die t-PA-Synthese in MC zu untersuchen. Dazu wurden konfluent gewachsene Zellen für 48 Stunden mit verschiedenen HA-Konzentrationen (10 – 100 mg/dL) inkubiert. Im Überstand wurde dann die t-PA-Konzentration mittels ELISA gemessen. Dabei wurde ein Abfall gesehen, der ab einer Konzentration von 50 mg/dL signifikant war (Kontrolle: 3,422 ng/10⁵ Zellen versus HA 50 mg/dL: 1,928 ng/10⁵ Zellen; p = 0,0077) und sich durch die höchste eingesetzte Konzentration von 100 mg/dL noch steigern ließ (Kontrolle: 3,422 ng/10⁵ Zellen versus HA 100 mg/dL: 1,811 ng/10⁵ Zellen; p = 0,0077) (Abb. 5)

Dieser Unterschied war auch von der Inkubationszeit abhängig. So wurden konfluente MC mit HA der Konzentration 100 mg/dL für 8, 24 und 48 Stunden inkubiert. Dabei war zwar die t-PA-Produktion in den mit HA stimulierten Zellen zu jedem Zeitpunkt geringer als in den Kontrollen, jedoch wurde der Unterschied erst bei 48 Stunden signifikant (Kontrolle: 3,422 ng/10⁵ Zellen vs. HA 100 mg/dL: 1,811 ng/10⁵ Zellen; p = 0,0077). (Abb. 6)

Ergebnisse

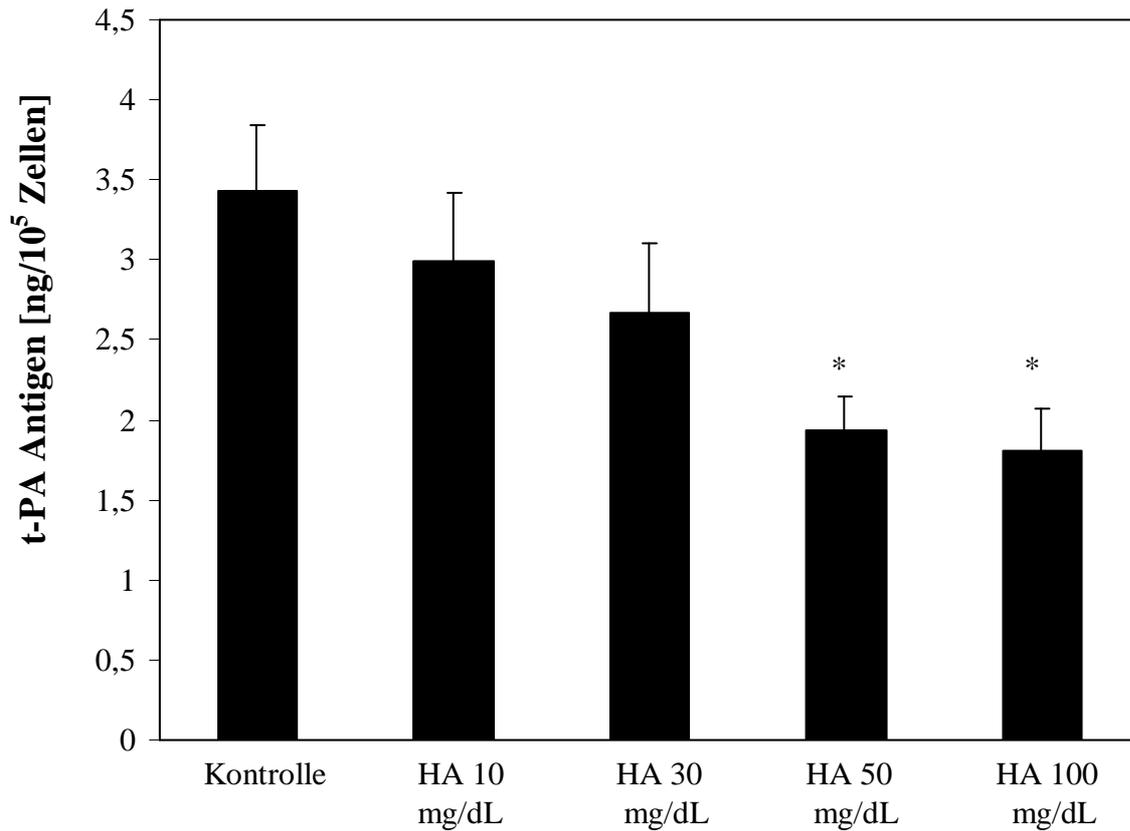


Abb. 5: Konzentrationsabhängiger Effekt von HA auf die t-PA Synthese in MC. MC wurden für 48 Stunden in M199 zusammen mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert. Danach wurde die t-PA Konzentration des Überstandes mittels ELISA gemessen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (\pm SEM) von sechs unabhängigen Experimenten. *P < 0,008 im Vergleich zur Kontrolle

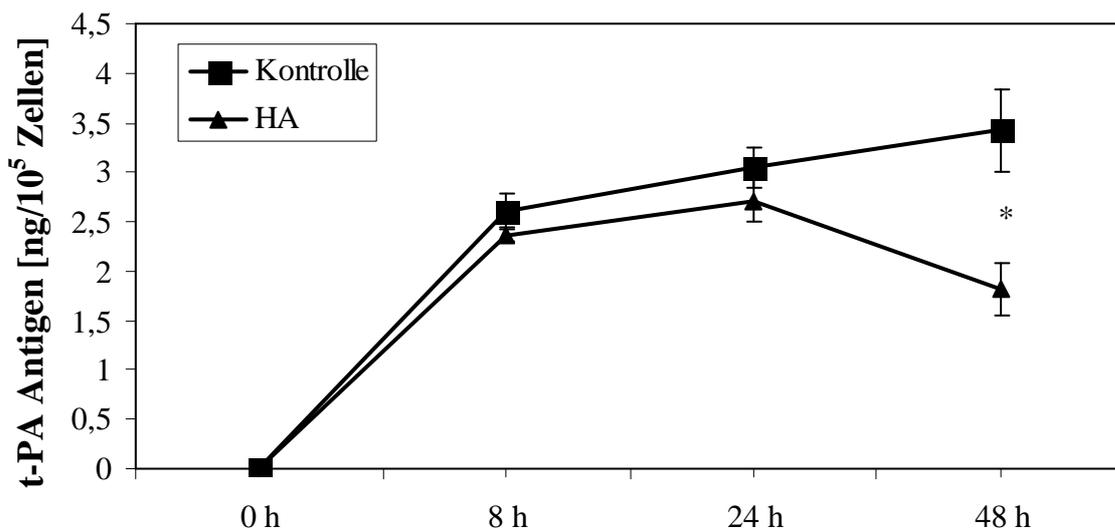


Abb. 6: Zeitabhängigkeit der t-PA Synthese in MC bei Stimulation mit HA (100 mg/dL) (\blacktriangle) im Vergleich zur Kontrolle (\blacksquare). Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von sechs unabhängigen Experimenten. *P < 0,008 im Vergleich zur Kontrolle

5.1.2 Die Auswirkung von hochmolekularem Hyaluronan auf die PAI-1 Synthese in MC

Auch die Menge an PAI-1 wurde mittels ELISA im Überstand von mit HA stimulierten MC gemessen. Im Konzentrationsverlauf (es wurden ebenfalls HA-Konzentrationen von 10 – 100 mg/dL eingesetzt) zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation ein Anstieg von PAI-1. Dieser war ab einer Konzentration von 50 mg/dL signifikant (Kontrolle: 1938,4 ng/10⁵ Zellen versus HA 100 mg/dL: 2484,0 ng/10⁵ Zellen; p = 0,0431) und konnte durch die höchste eingesetzte HA-Konzentration von 100 mg/dL noch gesteigert werden (Kontrolle: 1938,4 ng/10⁵ Zellen vs. HA 100 mg/dL: 2712,6 ng/10⁵ Zellen; p = 0,0431). (Abb. 7)

Auch die PAI-1 Produktion in MC war zeitabhängig. Unter den gleichen Inkubationszeiten wie für die Bestimmung der t-PA Produktion (8, 24, und 48 Stunden) und der HA-Konzentration von 100 mg/dL ergab sich auch hier ein signifikanter Unterschied erst nach 48 Stunden Inkubationszeit (Kontrolle: 1938,4 ng/10⁵ Zellen vs. HA 100 mg/dL: 2712,6 ng/10⁵ Zellen; p = 0,0431). (Abb. 8)

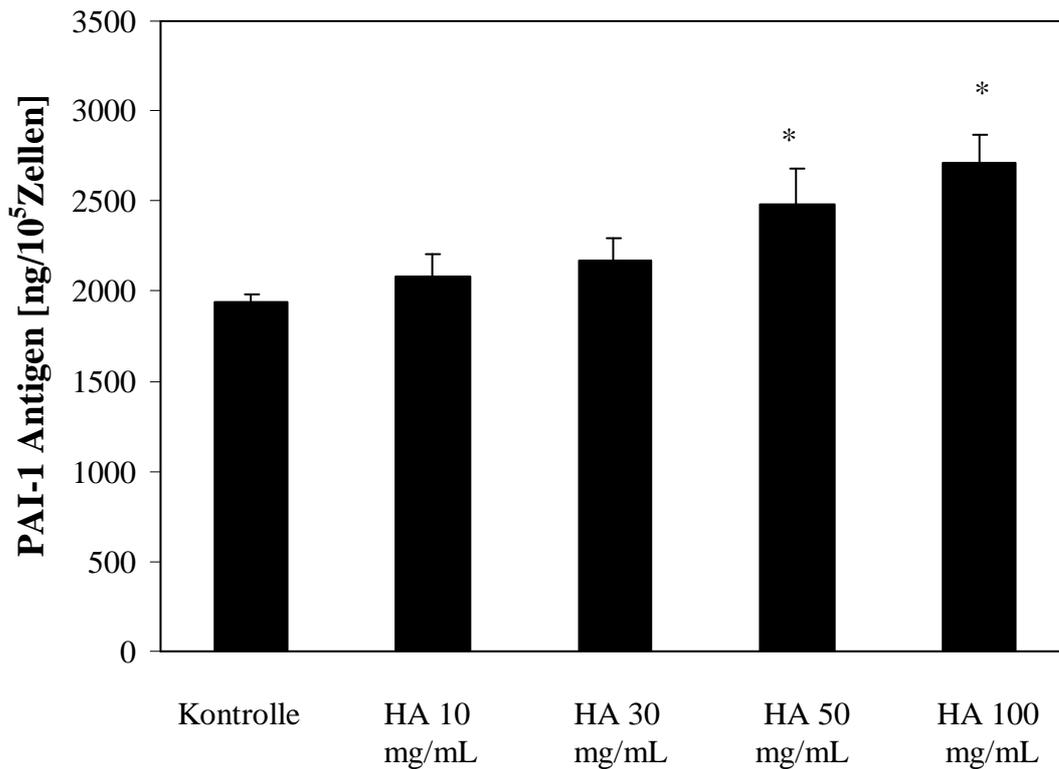


Abb. 7: Konzentrationsabhängiger Effekt von HA auf die PAI-1 Synthese in MC. MC wurden für 48 Stunden in M199 zusammen mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert. Danach wurde die PAI-1 Konzentration des Überstandes mittels ELISA gemessen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (\pm SEM) von sechs unabhängigen Experimenten. *P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

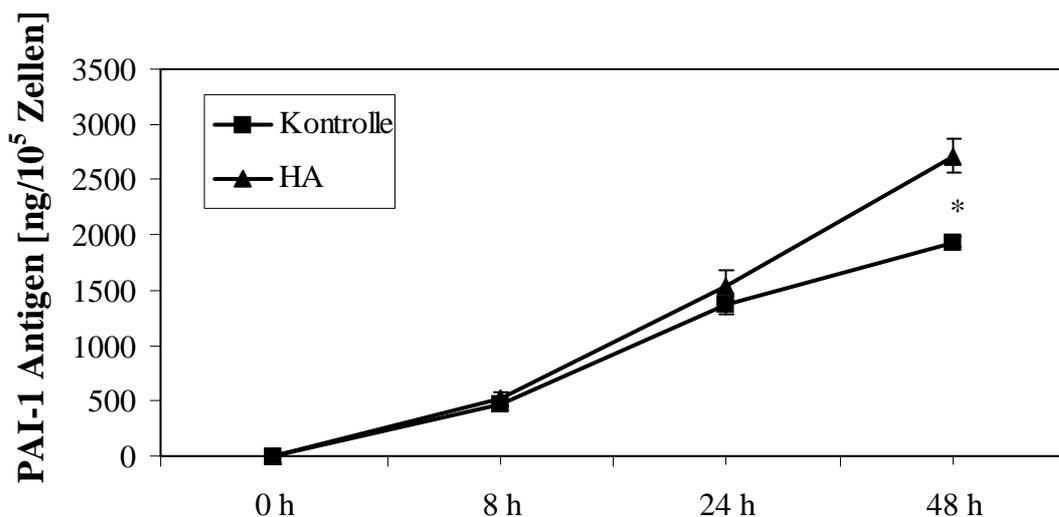


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der PAI-1 Synthese in MC bei Stimulation mit HA (100 mg/dL) (▲) im Vergleich zur Kontrolle (■). Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von sechs unabhängigen Experimenten. *P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

5.1.3 Der Einsatz einer anderen HA-Präparation

Um die Wahrscheinlichkeit von Artefakten wie Kontaminationen (trotz Expertise, die eine Absenz von LPS garantiert) etc. zu minimieren, wurde die Messung der t-PA und PAI-1 Synthese in konfluenten MC auch nach Stimulation mit HA eines anderen Herstellers (Firma ICN, Eschwege, Deutschland) durchgeführt. Hier beschränkten sich die Bedingungen nach den bereits geschilderten Ergebnissen allerdings auf die Konzentration 50 und 100 mg/dL HA sowie die Inkubationszeit 48 Stunden. Auch hier ließ sich ein deutlicher, HA-konzentrationsabhängiger Abfall der t-PA Produktion in MC feststellen (Kontrolle: 3,803 ng/10⁵ Zellen; HA 50 mg/dL: 2,609 ng/10⁵ Zellen und HA 100 mg/dL: 2,016 ng/10⁵ Zellen). Eine Signifikanzprüfung erfolgte auf Grund der Anzahl von drei unabhängigen Experimenten nicht. (Abb. 9)

In der HA-assoziierten PAI-1 Produktion konnte ebenfalls in Übereinstimmung mit den bereits durchgeführten Versuchen ein Anstieg der PAI-1 Produktion beobachtet werden. (Kontrolle: 1450,7 ng/10⁵ Zellen; HA 50 mg/dL: 1646,7 ng/10⁵ Zellen und HA 100 mg/dL: 2197,3 ng/10⁵ Zellen). Eine Signifikanzprüfung erfolgte hier aus oben genanntem Grund ebenfalls nicht. (Abb. 10)

Die Konsistenz der HA-bedingten Veränderungen in der mesothelialen t-PA und PAI-1 Produktion bei Verwendung der beiden verschiedenen HA-Präparationen weist stark darauf hin, dass nicht Kontaminationen der eingesetzten Präparate Ursache dieser Veränderungen sind.

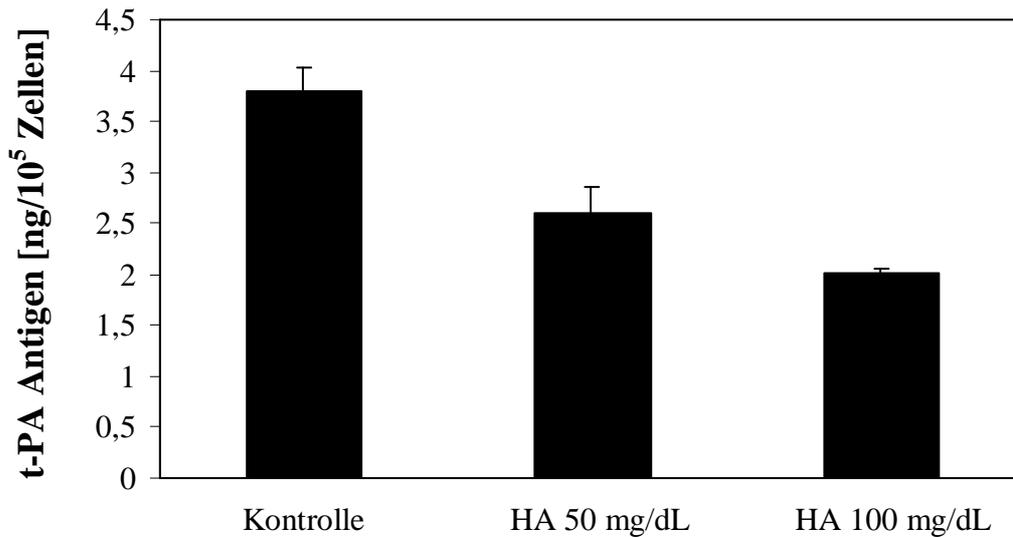


Abb. 9: Konzentrationsabhängiger Effekt von HA eines anderen Herstellers auf die t-PA Synthese in MC.

MC wurden für 48 Stunden in M199 zusammen mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert. Danach wurde die t-PA Konzentration des Überstandes mittels ELISA gemessen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

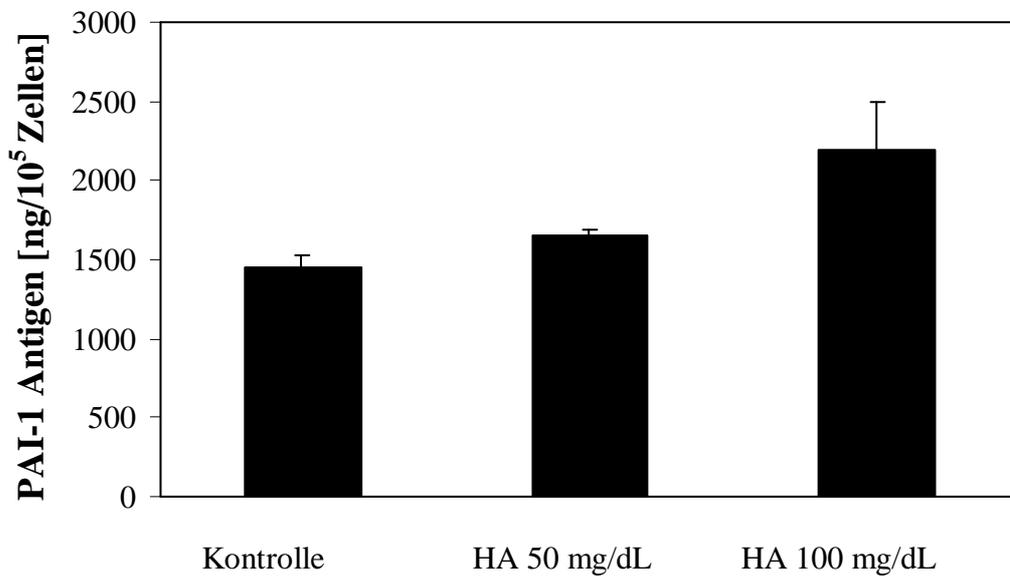


Abb. 10: Konzentrationsabhängiger Effekt von HA eines anderen Herstellers auf die PAI-1 Synthese in MC.

MC wurden für 48 Stunden in M199 zusammen mit dem jeweiligen Stimulus inkubiert. Danach wurde die PAI-1 Konzentration des Überstandes mittels ELISA gemessen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

5.2 Untersuchung der Auswirkung von HA auf die mRNA Expression mesothelialer Fibrinolysefaktoren

Um die auf Proteinebene gesehenen Effekte von HA auf die Produktion von t-PA und PAI-1 auch auf Transkriptionsebene nachvollziehen zu können, wurde die Northern Blot Analyse eingesetzt. Wie in den Abbildungen zu sehen ist, zeigt sich für t-PA eine deutliche konzentrationsabhängige (eingesetzt waren die HA-Konzentrationen 10, 50 und 100 mg/dL) (Abb. 11) und zeitabhängige (Inkubationszeiten von 8 und 12 Stunden) Abnahme der mRNA (Abb. 13)

Die Schwärzungen auf den Blots (die den mRNA-Mengen zur jeweiligen Bedingung entsprechen) wurden densidometrisch erfasst und mittels dem jeweils zugehörigen GAPDH-Wert aneinander angeglichen. So konnte, als Relativwert zur Kontrolle (1), für HA 10 mg/dL (0,88), HA 50 mg/dL (0,80) und HA 100 mg/dL (0,55) der konzentrationsabhängige Effekt auf die t-PA mRNA-Menge annähernd quantitativ nachvollzogen werden (siehe Abb. 12A). Die HA-induzierten t-PA-Veränderungen zeigten auf mRNA-Ebene eine ähnliche Kinetik wie auf Protein-Ebene (siehe Abb. 14A).

Für die PAI-1 mRNA-Menge ergaben sich weder durch Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen noch durch unterschiedliche Inkubationszeiten Änderungen. Auch dies wurde mit der oben erwähnten densidometrischen Methode quantitativ dargestellt (siehe Abb. 12B und 14B).

Desweiteren wurde im Northern Blot die mRNA-Expression für das low-density lipoprotein receptor protein (LRP), das für die Internalisierung von t-PA in MC und dessen anschließende Degradation verantwortlich ist, [134] gemessen. Da die mRNA Expression für LRP unter allen Bedingungen weitestgehend konstant blieb, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die HA-induzierte Verminderung der t-PA Menge im Überstand kultivierter MC durch Internalisierung und Degradation zustande gekommen ist. Vielmehr muss von einer verminderten Transkription oder einer reduzierten t-PA mRNA Stabilität

Ergebnisse

ausgegangen werden. Was den Anstieg des PAI-1 Proteins betrifft, so liefert die Northern Blot Analyse dafür auf mRNA Ebene keine Erklärung.

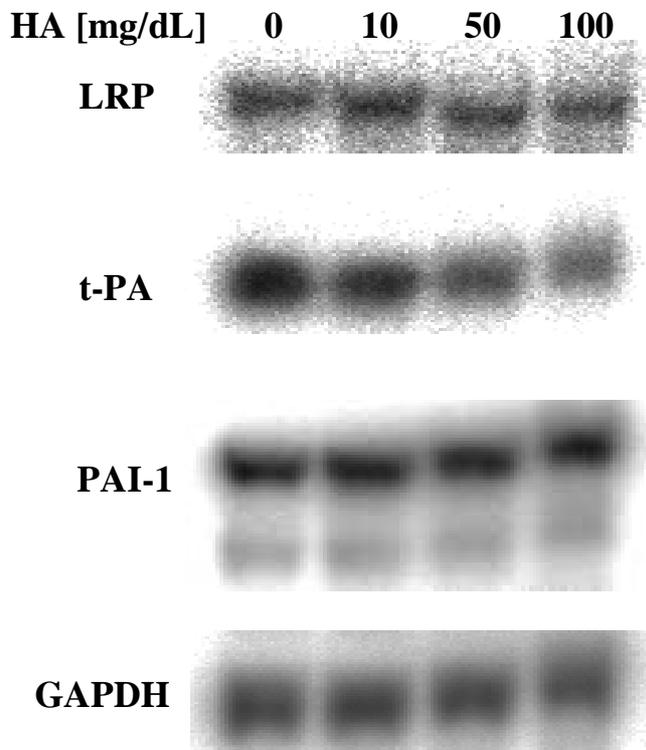


Abb. 11: mRNA Expression von t-PA, PAI-1 und LRP in MC unter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von HA.

MC wurden für 12 Stunden mit verschiedenen HA-Konzentrationen (10 – 100 mg/dL) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und per Northern Blot Hybridisierung hinsichtlich der mRNA Expression von t-PA, PAI-1, LRP und GAPDH analysiert. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

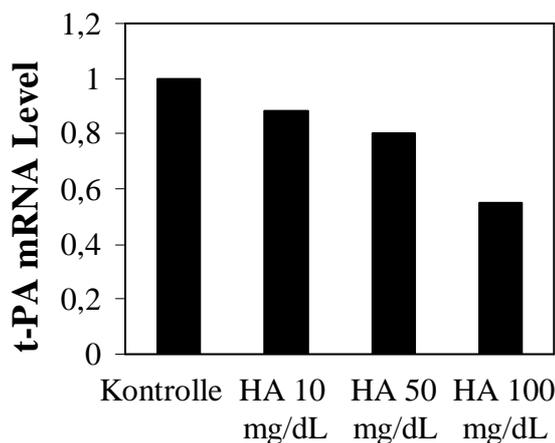


Abb. 12A

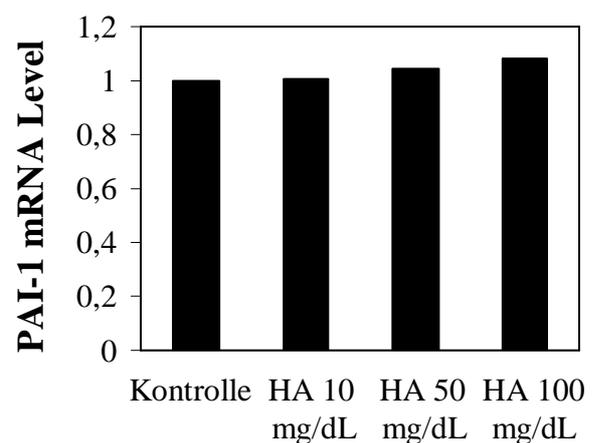


Abb. 12B

Abb. 12 A + B: Die Signale für die t-PA (A) und PAI-1 (B) mRNA wurden densitometrisch quantifiziert und etwaige Mengenmissverhältnisse mittels der korrespondierenden mRNA Signale für GAPDH korrigiert. Die mRNA-Menge ist als Verhältnis zum jeweiligen Wert unter Kontrollbedingungen angegeben.

Ergebnisse

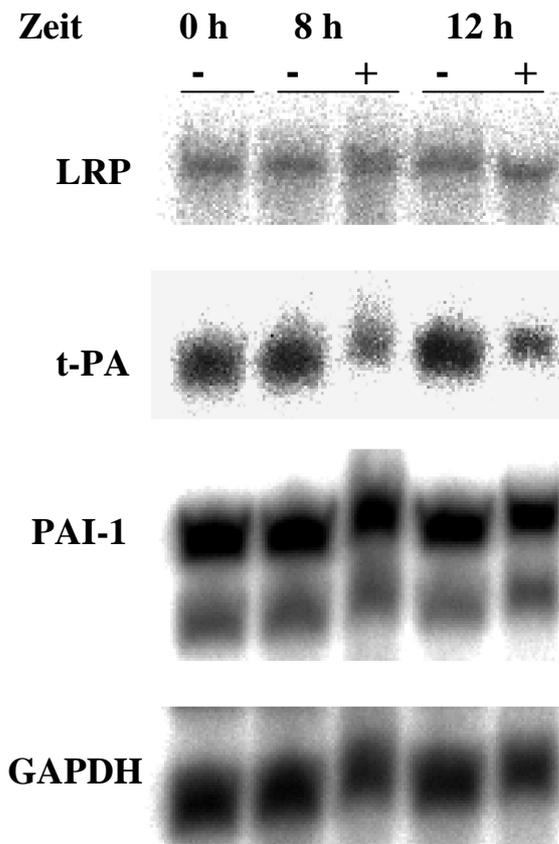


Abb. 13: Zeitabhängige mRNA Expression von t-PA, PAI-1 und LRP in MC unter Stimulation mit HA . MC wurden für 8 und 12 Stunden mit HA der Konzentration 100 mg/dL (+) oder dem Kontrollmedium (-) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend isoliert und per Northern Blot Hybridisierung hinsichtlich der mRNA Expression von t-PA, PAI-1, LRP und GAPDH analysiert. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

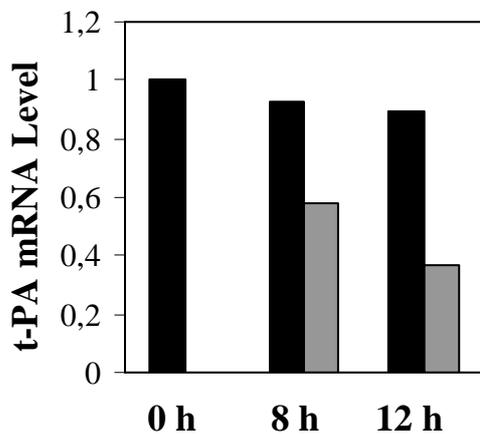


Abb. 14A

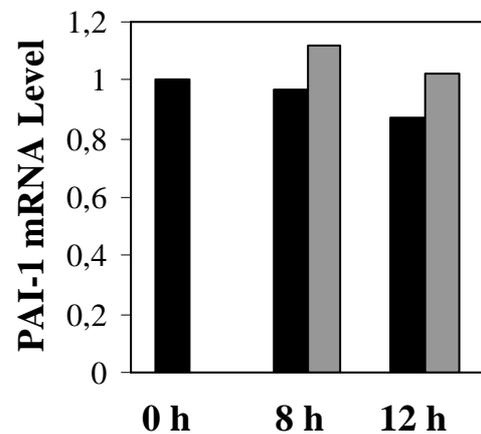


Abb. 14B

Abb. 14 A + B: Die Signale für die t-PA (A) und PAI-1 (B) mRNA wurden densitometrisch quantifiziert und etwaige Mengenmissverhältnisse mittels den korrespondierenden mRNA Signale für GAPDH korrigiert. Die mRNA-Menge ist als Verhältnis zum jeweiligen Wert unter Kontrollmedium zum Zeitpunkt 0 h angegeben. Kontrollwerte sind als schwarze Balken angegeben und die Werte nach Inkubation mit HA (100 mg/dL) für den jeweiligen Zeitraum als graue Balken dargestellt.

5.3 Untersuchung möglicher Wege der Signaltransduktion

Um Hinweise darauf zu erhalten, über welche Mechanismen HA die Synthese von t-PA und PAI-1 in MC verändert, wurden mehrere gängige Signaltransduktionswege untersucht. Wie bereits beschrieben, besitzen MC den CD44-Rezeptor auf ihrer Oberfläche (s. 2.5.2). Die Blockade dieses Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper BU75 konnte allerdings die Effekte von HA auf die mesotheliale t-PA und PAI-1 Synthese nicht beeinflussen: Weder veränderte die einstündige Vor- und anschließende Koinkubation mit BU75 die basale t-PA bzw. PAI-1 Synthese signifikant (womit ein intrinsischer Effekt ausgeschlossen ist), noch verhinderte BU75 den HA-induzierten t-PA Abfall bzw. PAI-1 Anstieg (womit eine Beteiligung von CD44 bei den gesehenen Veränderungen weitgehend ausgeschlossen ist). (Abb. 15A und 15B) Weitere - für HA bereits beschriebene - Signaltransduktionsmechanismen sind die Aktivierung von ERK1/ERK2 oder p38. Für die Hemmung von ERK1/ERK2 wurde PD98059 als spezifischer Inhibitor eingesetzt. Wie Abb. 16A und 16B demonstrieren, hatte jedoch die Koinkubation keinen Effekt auf die oben beschriebenen HA-induzierten Alterationen in der mesothelialen Produktion von t-PA und PAI-1. Als gebräuchlicher Inhibitor der p38 Aktivierung wurde SB203580 verwendet. Wie in Abb. 17A zu sehen, zeigten sich hier interessanterweise für die unter HA verminderte t-PA Synthese ein signifikanter Unterschied nach Koinkubation mit SB203580. (HA 100 mg/dL: 11,6 ng/10⁵ Zellen vs. 17,8 ng/10⁵ Zellen bei SB und HA) Auf die gesteigerte PAI-1 Synthese hatte SB203580 jedoch keinen Einfluss (Abb. 17B). Somit lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich feststellen, dass p38 (vermutlich partiell) in den HA-induzierten Syntheseabfall für t-PA involviert ist, auf die gesteigerte PAI-1 Synthese jedoch keinen Einfluss hat. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch die oben erwähnten Versuche einige Signaltransduktionswege weitestgehend ausgeschlossen werden konnten, die an weiteren HA-induzierten Effekten beteiligt sind. [59] Die endgültige Klärung des beschrifteten

Ergebnisse

Mechanismus - sowohl in Hinblick auf die mesotheliale t-PA als auch auf die PAI-1 Produktion - muss so vorerst offen bleiben.

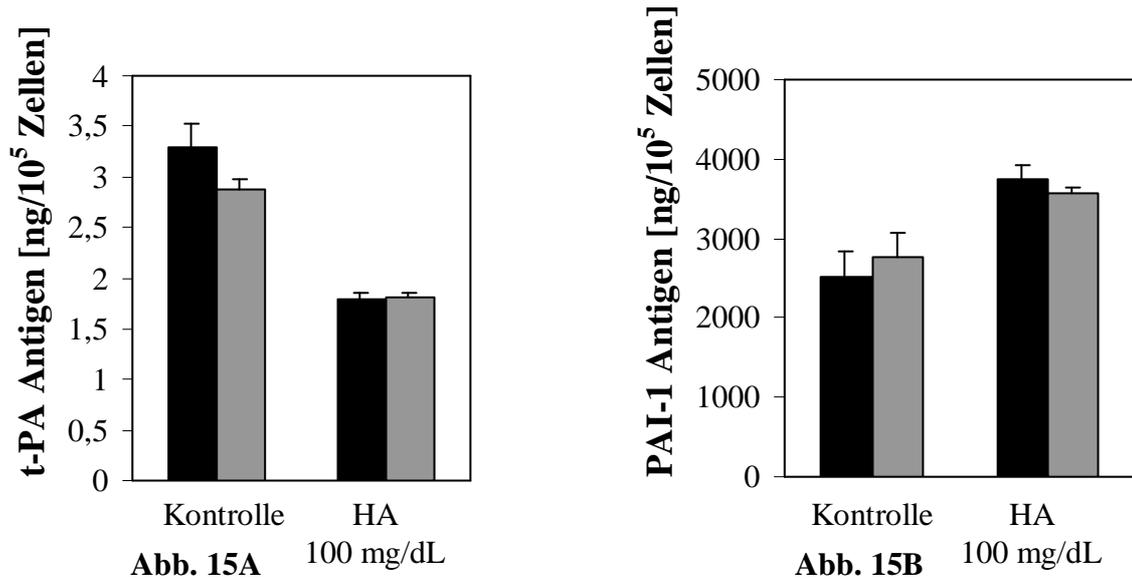


Abb. 15: Effekt einer CD44-Blockade auf die t-PA (A) und PAI-1 (B) Produktion unter HA-Stimulation.

MC wurden für 60 Minuten mit dem CD44-blockierenden Antikörper Mab BU75 (10 µg/mL) (graue Balken) oder mit Kontrollmedium (schwarze Balken) vorinkubiert und anschließend für 48 Stunden mit Mab BU75 (10 µg/mL) und Kontrollmedium bzw. HA 100 mg/dL koinkubiert (graue Balken) oder ausschließlich mit Kontrollmedium bzw. HA 100 mg/dL inkubiert (schwarze Balken). Die Überstände wurden anschließend auf t-PA bzw. PAI-1 mittels ELISA untersucht. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (±SEM) von sechs unabhängigen Experimenten.

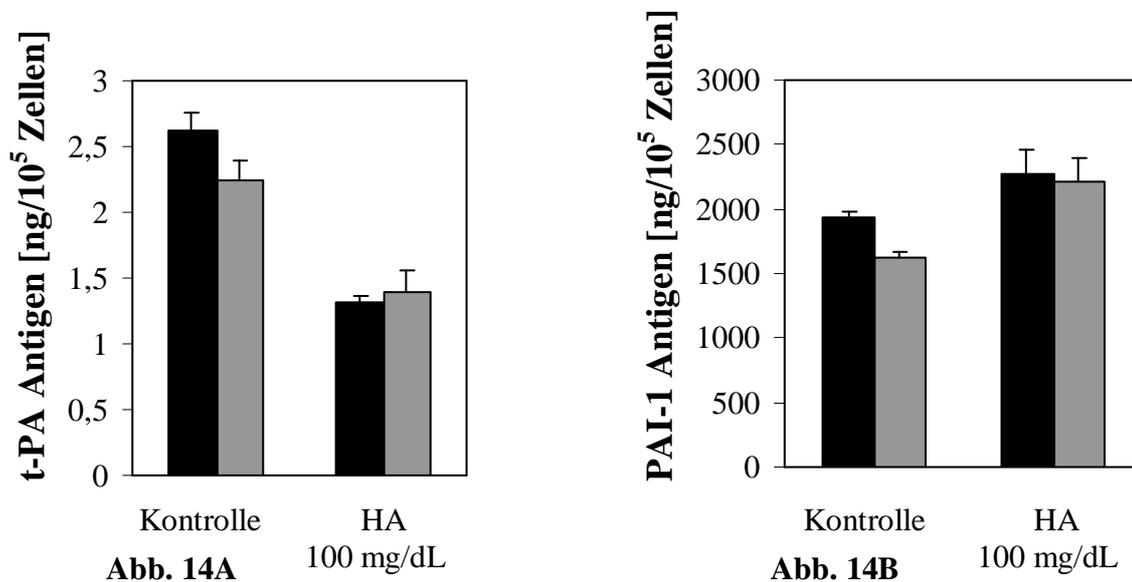


Abb. 16: Effekt einer ERK1/ERK2-Blockade auf die t-PA (A) und PAI-1 (B) Produktion unter HA-Stimulation.

MC wurden für 48 Stunden mit PD98059 (30 µM) und Kontrollmedium bzw. HA 100 mg/dL koinkubiert (graue Balken) oder ausschließlich mit Kontrollmedium bzw. HA 100 mg/dL inkubiert (schwarze Balken). Die Überstände wurden anschließend auf t-PA bzw. PAI-1 mittels ELISA untersucht. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (±SEM) von sechs unabhängigen Experimenten.

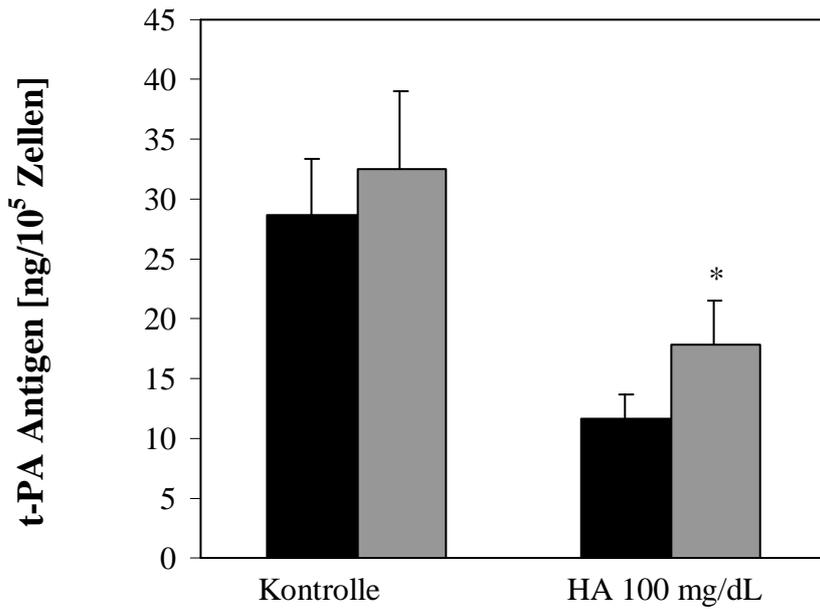


Abb. 17A

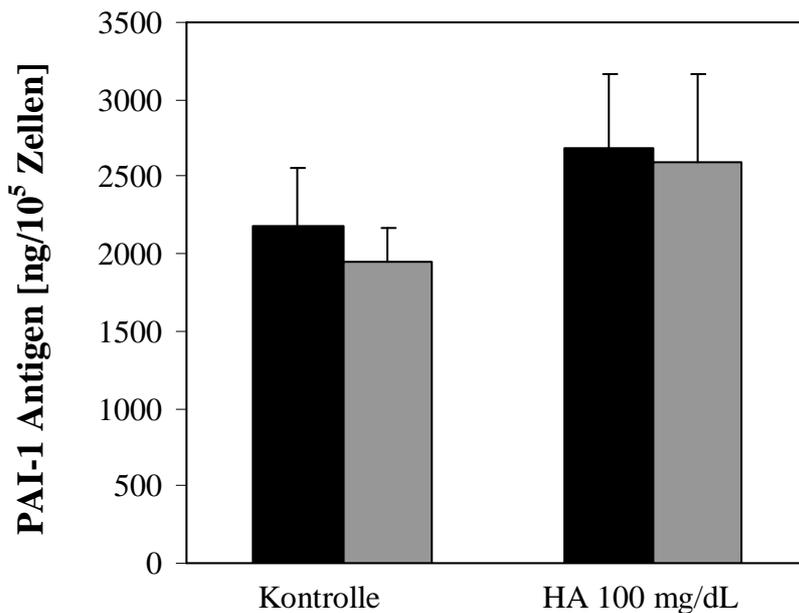


Abb. 17B

Abb. 17: Effekt einer p38-Blockade auf die t-PA (A) und PAI-1 (B) Produktion unter HA-Stimulation.

MC wurden für 48 Stunden mit SB203580 (3 µM) und Kontrollmedium bzw. HA 100 mg/dL koinkubiert (graue Balken) oder ausschließlich mit Kontrollmedium bzw. HA 100 mg/dL inkubiert (schwarze Balken). Die Überstände wurden anschließend auf t-PA bzw. PAI-1 mittels ELISA untersucht. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (±SEM) von sechs unabhängigen Experimenten.

*** p<0,05 für den Unterschied zwischen Koinkubation von HA 100 mg/dL und SB oder ausschließliche Inkubation mit HA 100 mg/dL.**

5.4 Auswirkungen einer Koinkubation von $\text{TNF}\alpha$ und HA auf die t-PA Synthese in MC

In einer 2001 erschienenen Arbeit beschreibt Reijnen et al. die positiven Auswirkungen von HA auf mit $\text{TNF}\alpha$ vorstimulierte MC hinsichtlich der Produktion von mesothelialen Fibrinolysefaktoren. [122] Ebenso wie in der erwähnten Arbeit sahen wir im Kulturüberstand bei der Koinkubation von $\text{TNF}\alpha$ (10 – 1000 U/mL) und HA (100 mg/dL) jedoch keine Steigerung der durch $\text{TNF}\alpha$ verminderten t-PA Synthese. Ganz im Gegenteil, führt doch - wie Abb. 18 zeigt - eine Koinkubation mit HA und $\text{TNF}\alpha$ noch zu einer zusätzlichen, konzentrationsabhängigen Reduktion der t-PA Synthese. Vor diesem Hintergrund sind im Kapitel 6.2 wesentliche Kritikpunkte an der oben zitierten Arbeit aufgeführt.

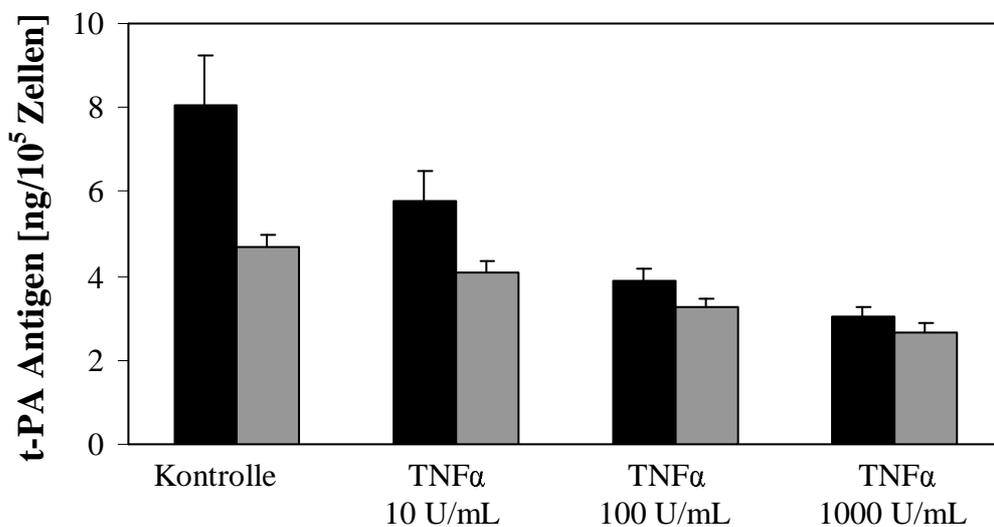


Abb 18: Effekt einer Koinkubation von $\text{TNF}\alpha$ und HA auf die t-PA Produktion in MC. MC wurden entweder nur mit $\text{TNF}\alpha$ (0 – 1000 U/mL) (schwarze Balken) inkubiert oder mit $\text{TNF}\alpha$ und HA 100 mg/dL (graue Balken) koinkubiert. Die Inkubationszeit betrug jeweils 48 Stunden. Danach wurde die t-PA Konzentration des Überstandes mittels ELISA gemessen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte (\pm SEM) von sechs unabhängigen Experimenten.

6. Diskussion

6.1 Das Zellkulturmodell

In den vergangenen Jahrzehnten wurden Zellkulturen als Modellsysteme zur Untersuchung (patho-) physiologischer, molekularbiologischer und pharmakologischer Fragestellungen immer wichtiger. Kulturen peritonealer Mesothelzellen dienten insbesondere zu Studien, welche die Klärung der Biokompatibilität von Peritonealdialyselösung zum Ziel hatten. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass mit der Untersuchung an Zellkulturen nur ein sehr begrenzter Bereich des Organismus isoliert betrachtet wird. Interaktionen mit der physiologischerweise vorhandenen Umgebung der Zellen (im Fall der MC-Kultur beispielsweise Fibroblasten, Makrophagen u.a.) müssen so außer Acht gelassen werden. Allerdings bietet das Zellkulturmodell den Vorteil, unmittelbar an humanen Zellen forschen zu können, während Tierversuche (welche die Untersuchung eines Organs, Organsystems oder gar des gesamten Organismus zulassen) immer mit Vorbehalten hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus behaftet sind.

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich primäre Kulturen verwendet, die jeweils neu aus Operationspräparaten des Omentum majus isoliert wurden. Zwar hätte die Möglichkeit bestanden, die Experimente auch mit einer immortalisierten Zelllinie humaner peritonealer Mesothelzellen durchzuführen, welche durch eine Transfektion mit dem SV40T Antigen entstanden ist. [43] Dadurch wäre die zeitintensive Neupräparation und die aufwendigeren Kulturbedingungen für Primärkulturen weggefallen. Jedoch besteht bei der Verwendung einer solchen Zelllinie immer die Möglichkeit, dass sie sich durch den Immortalisierungsprozess in manchen Eigenschaften von Zellen primärer Kulturen unterscheidet. Außerdem bietet die Verwendung von primären Zellkulturen die Möglichkeit, unterschiedliche Spender (mit jeweils unterschiedlichem Genom) zu betrachten, während die erwähnte Zelllinie

ausschließlich ein einziges Genom besitzt. Somit ist der Aussagewert hinsichtlich des Verhaltens von primären Zellen (wenn dieses einheitlich oder zumindest tendenziell übereinstimmend bei allen untersuchten Spendern auftritt) als größer einzuschätzen als durch Verwendung der transformierten Zelllinie. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass MC bereits im Bauchraum vorstimuliert sein können. Dies kann bei einer Peritonitis oder einer Peritonealkarzinose der Fall sein, da es unter diesen Bedingungen zu einer verstärkten Mediatorenfreisetzung im Bauchraum kommt, welche die vielfältigsten Änderungen im Verhalten von MC, nicht zuletzt hinsichtlich des mesothelialen fibrinolytischen Systems (siehe 2.4), hervorrufen kann. In diesem Fall wurden die Zellen nicht für Experimente verwendet.

Ebenfalls beachtet werden muss auch das Alter der Mesothelzellkulturen. MC lassen sich ungefähr nur bis zu sechsten Passage kultivieren. In höheren Passagen verlieren sie ihre Wachstums- und Teilungsfähigkeit, so dass keine konfluenten Zellrasen mehr entstehen. Auch verändert sich mit zunehmendem Alter die Syntheseleistung der Zellen. [136] Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden Zellen ausschließlich in der zweiten oder dritten Passage für die Experimente verwendet.

Wie bereits oben erwähnt, unterscheiden sich Zellen verschiedener Spender hinsichtlich ihres Genoms. Dies wurde dadurch deutlich, dass verschiedene Präparationen zum Teil unterschiedlich stark auf den gleichen Stimulus reagierten. Um solche genetisch determinierte Differenzen weitgehend ausgleichen zu können, wurde jedes Experiment mehrfach an verschiedenen Zellisolaten durchgeführt.

Zusammenfassend darf gesagt werden, dass das Zellkulturmodell sicher eine adäquate Methode war, die Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen. Gerade in der Zellkultur konnten größere HA-Konzentrationen als in den beschriebenen Tierversuchen [118] [55] [20] verwendet werden, welche die gefundenen

Veränderungen hinsichtlich der veränderten mesothelialen Synthese von fibrinolytischen Faktoren erst deutlich werden ließen.

6.2 Das peritoneale Fibrinolyse-System unter dem Einfluß von Hyaluronan

MC, die zahlenmäßig die größte Zellpopulation in der Bauchhöhle darstellen produzieren - wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt - ein vom Plasma unabhängiges, fibrinolytisches System. In der vorliegenden Arbeit konnte die Produktion von t-PA und PAI-1 durch MC, wie sie von vielen Autoren beschrieben wurde, [133] [66] [144] sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene bestätigt und nachvollzogen werden. Wie im Ergebnisteil dargestellt, beeinflusste die Zugabe von HA in geringeren Konzentrationen bis hin zu 30 mg/dL das Verhältnis der fibrinolytischen Faktoren zueinander weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene signifikant. Der Einsatz höherer HA-Konzentrationen veränderte jedoch die Gleichgewichtsverhältnisse von t-PA und PAI-1 zueinander, so dass eher ein profibrotischer Zustand anzunehmen ist: Die t-PA-Synthese war vermindert, die PAI-1-Synthese erhöht. Auf Proteinebene waren diese Veränderungen beim Einsatz von 50 mg/dL HA sowohl für t-PA als auch für PAI-1 signifikant und konnten durch den Einsatz von 100 mg/dL HA noch gesteigert werden. Ferner ließ sich auch eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit erkennen. Auf Transkriptionsebene ließ sich die Reduktion der mesothelialen t-PA-Produktion eindeutig nachvollziehen; für PAI-1 stieg die mRNA-Menge lediglich tendenziell in Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationszeit an und blieb diskordant zur deutlichen Steigerung auf Proteinebene. Für diesen Effekt konnte leider im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung gefunden werden. Möglicherweise besteht für PAI-1 ein Rezeptor der dieses internalisiert und degradiert, wie es für t-PA, u-PA und u-PA-PAI-1-Komplexe beschrieben ist. [134] [2] Eine HA-vermittelte verminderte Expression dieses möglichen

Rezeptors oder eine reduzierte Affinität zu PAI-1 würde dieses Ergebnis erklären. Auch LRP, das für die Internalisation von t-PA in MC verantwortlich ist, [134] besitzt eine Affinität zu PAI-1 – allerdings nur zu einem PAI-1-Proteinase-Komplex, wohingegen natives PAI-1 nicht mit LRP interagiert. [70] Da das Transkript für LRP unter HA-Stimulation konstant bleibt, ergibt sich hier hinsichtlich der PAI-1-Aufnahme nur die Möglichkeit einer verminderten Proteinase-Sekretion unter HA – wenn denn dieser Weg beschränkt wird. Eine Proteinasereduktion durch intraartikuläre HA-Injektionen ist beispielsweise für Knorpel- und Synovialgewebe dokumentiert. [138] [58]

Hinsichtlich der verminderten t-PA Menge im Überstand macht die gleichbleibende mRNA-Menge für LRP unter HA-Stimulation eine rezeptorvermittelte Endocytose als (Mit-)Ursache für die Verringerung sehr unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die HA eine Verschiebung des mesothelialen Fibrinolyse-Systems in Richtung profibrotischem Zustand zuweisen, stehen in gewissem Gegensatz zur Arbeit einer niederländisch-schwedischen chirurgisch ausgerichteten Arbeitsgruppe. [122] Diese beschreibt eine HA-induzierte Verstärkung der fibrinolytischen Antwort nach Stimulation der Zellen mit $\text{TNF}\alpha$, welches sich als Entzündungsmediator postoperativ und während Peritonitiden in erhöhtem Maße in der Abdominalhöhle befindet. [141] [4] [1] [50] Es werden jedoch nie Versuche an unstimulierten MC beschrieben. Interessanterweise zeigen die in der erwähnten Arbeit verwendeten Zellen unter $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine hohe mRNA-Kopienzahl für t-PA, die sogar höher als die Kopienzahl der PAI-1-mRNA liegt. In einer früheren Arbeit, welche die Modulation des mesothelialen fibrinolytischen Systems durch Entzündungsmediatoren beschreibt, wird dagegen die t-PA mRNA-Produktion unter $\text{TNF}\alpha$ fast vollständig unterdrückt, während die PAI-1 mRNA-Produktion deutlich erhöht wird und sich im Northern Blot als eindeutige Schwärzung

darstellt, wohingegen die t-PA-Bande fast nicht zu sehen ist. [133] Vor allem durch die kategorische Vorstimulation in der oben erwähnten Arbeit, können deren Ergebnisse mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit nur schwerlich verglichen werden. Interessanterweise konnte dieselbe Arbeitsgruppe ihre Ergebnisse im Tierversuch nicht bestätigen: Ratten wurden nach Auslösung einer Peritonitis einer Operation des Kolons unterzogen: Weder eine in die Bauchhöhle eingebrachte bioresorbierbare Hyaluronan-Carboxymethylcellulose-Membran noch HA-Lösung veränderte Konzentration oder Aktivität von t-PA. [121]

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung einer Koinkubation von HA und TNF α auf die mesotheliale t-PA Synthese untersucht. Wie in der oben zitierten Arbeit ließen sich die durch TNF α erzielten t-PA Verminderungen im Zellüberstand durch HA in keinster Weise abschwächen. Koinkubation mit HA führte sogar zu tendenziell noch niedrigeren t-PA Konzentrationen. Auch wenn Reijnen et al. damit argumentieren, dass die t-PA Konzentration im Zelllysat ansteigt, [122] so lassen sich die daraus gezogenen Schlüsse hinsichtlich Verminderung des Fibrosierungsrisikos vor dem Hintergrund der vorliegenden Arbeit an unstimulierten Zellen nur schwer nachvollziehen. Abgesehen davon erscheint die t-PA Bestimmung aus dem Kulturüberstand geeigneter, um Aussagen über das fibrinolytische System zu machen, als die Bestimmung aus Zelllysaten. Die Komponenten müssen schließlich erst in die Peritonealhöhle sezerniert werden, um dort wirksam werden zu können.

6.3 Signaltransduktion der durch HA induzierten Veränderungen in der Synthese mesothelialer Fibrinolysefaktoren.

Um mögliche Signaltransduktionswege zu identifizieren, die an den HA-vermittelten Veränderungen in der mesothelialen Synthese von t-PA und PAI-1 beteiligt sind, wurden verschiedene Inhibitoren von Signaltransduktionswegen verwendet, welche in diversen Arbeiten in Zusammenhang mit HA-Wirkungen beschrieben sind und/oder in MC vorkommen. MC besitzen mit dem CD44 Molekül einen Rezeptor für HA, der in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. [126] Es wurde beschrieben, dass Effekte von HA durch das CD44 Molekül vermittelt sind. [111] [95] [41] Die Wirkung verschieden großer HA Fragmente auf die mesotheliale Synthese von MCP-1 und IL-8 ist ebenfalls – zumindest teilweise – durch CD44 vermittelt. So wurde auch hier der monoklonale Antikörper BU75 benutzt, der das HA bindende Epitop des CD44 Moleküls blockiert. [59] Durch Verwendung dieses Antikörpers ließ sich die HA-Wirkung auf die Produktion von t-PA und PAI-1 in MC jedoch nicht verhindern. Möglicherweise gibt es andere Rezeptoren für HA, über die der hier beschriebene Effekt vermittelt wird; möglicherweise ist auch die Blockierung der Bindungsstelle für das Polysaccharid HA durch ein Protein (den Antikörper BU75) insuffizient. Derartige Überlegungen wurden bereits in anderen Arbeiten diskutiert. [7] [95]

Haslinger et al. konnten zeigen, dass sich der HA-Fragment-Effekt auf die Synthese von MCP-1 und IL-8 durch Blockade der ERK1/ERK2-Kaskade mittels PD98509 signifikant vermindern läßt. Die Wirkung von hochmolekularem HA auf die Produktion von Fibrinolysefaktoren in MC ließ sich jedoch nicht verhindern: Die Koinkubation mit PD98509 in gängiger Konzentration hatte keinen Effekt.

Interessanterweise war SB203580, ein Inhibitor der SAPK2/p38-Kaskade, [25] [28] welcher den Effekt von HA-Fragmenten auf MCP-1 und IL-8 Synthese nicht blockieren konnte, [59] in der Lage, die von hochmolekularem HA

Diskussion

hervorgerufene Reduktion von mesothelial produziertem t-PA signifikant abzuschwächen. Auf die Steigerung der PAI-1 Produktion durch hochmolekulares HA hatte die SAPK2/p38-Blockade jedoch keinen Einfluss.

So konnten in dieser Arbeit die beschrifteten Signaltransduktionswege nicht vollständig geklärt werden. Ebenso wenig kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den HA-Effekt - zumindest teilweise - um auf MC wirkenden osmotischen Stress oder Viskositätseffekte handelt. Die Beteiligung des SAPK2/p38-Weges, der u.a. durch zellulären Stress aktiviert wird, [25] könnte hierfür ein Hinweis sein.

Auch wenn die beteiligten Signaltransduktionswege momentan ungeklärt bleiben müssen, verändert HA die Synthese mesothelialer Fibrinolysefaktoren signifikant und spielt auch in nichtmesothelialen Gerinnungs- und Fibrinolyseprozessen ebenso wie in Entzündungsvorgängen eine nicht unerhebliche Rolle, wie die nächsten Kapitel aufzeigen.

6.4 Hyaluronan in extramesothelialen Gerinnungs- und Fibrinolyseprozessen

HA spielt in nichtzellulären Gerinnungsprozessen eine nicht unerhebliche Rolle: Es bindet spezifisch an Fibrinogen, [83] was die Gerinnungszeit durch eine erhöhte Bildungsrate von Fibrinpolymeren reduziert. [82] Diese Fibringerinnsel weisen sich außerdem durch eine vergrößerte Trübung aus. [82] Werden die Carboxylgruppen von HA einer Benzylveresterung unterzogen, so lässt sich dieser Effekt in Abhängigkeit vom Grad der Veresterung aufheben. Nichtverestertes HA (so wie es auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam) verursacht außerdem eine signifikante Hemmung der Fibrinolyse, wenn dem Gerinnsel t-PA beigelegt wurde. [130]

Aber auch in zellulär vermittelten Fibrinolyseprozessen außerhalb des mesothelialen Systems wird HA eine nicht unbedeutende Rolle zugewiesen: In Gefäßwänden von Diabetespatienten kommt HA in erhöhten Konzentrationen vor. [60] Es steht im Verdacht, hier die Atherosklerose zu beschleunigen, v.a. durch eine lokomotorische Wirkung auf die glatten Muskelzellen, die über den HA-spezifischen CD44-Rezeptor vermittelt ist. [128] [74] [3] Werden humane aortale glatte Muskelzellen mit HA inkubiert, so zeigt sich ein zeit- und konzentrationsabhängiger Anstieg der PAI-1 Konzentration im Überstand. Die HA-Konzentrationen, bei denen signifikante Effekte auftreten, sind mit den Konzentrationen, die in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurden, vergleichbar und lagen im Bereich zwischen 1 und 100 mg/dL. Zwar bleibt die t-PA-Konzentration in der erwähnten Arbeit von der HA-Inkubation unbeeinflusst, jedoch zeigt sich ein Abfall der u-PA-Konzentration im Überstand. [93]

Auch HA-Fragmente besitzen antifibrinolytische Wirkungen: So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass sich in Mausmakrophagen die PAI-1 Produktion durch Inkubation mit HA-Fragmenten stimulieren und die u-PA Produktion reduzieren lässt. Beide Effekte konnten sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-

Ebene nachvollzogen werden. [71] Die Regulation wird als aktivitätsabhängig beschrieben: Makrophagen, die vorher mit dem SV-40-Virus transformiert wurden und aktivierte Makrophagen von mit Bleomycin behandelten Ratten reagieren auf HA-Stimulation mit der oben erläuterten Verschiebung der fibrinolytischen Mediatoren, während nicht aktivierte Makrophagen von mit NaCl behandelten Ratten keine Reaktion auf HA zeigen. [71] Inwieweit die zuletzt genannten Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit in Zusammenhang gebracht werden können, muss offen bleiben, da die Versuche hier an Zelllinien aus Tiermodellen vonstatten gingen und außerdem HA-Fragmente verwendet wurden, die in dem Ruf stehen, andere Eigenschaften als hochmolekulares HA zu besitzen (siehe Kapitel 2.5.2), welches in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

6.5 Hyaluronan im Kontext inflammatorischer Gewebsreaktionen

Da HA von vielen Zellen mesenchymaler Herkunft synthetisiert wird, kommt es – v.a. im Bindegewebe – ubiquitär vor, wo es einen stabilisierenden Faktor der einzelnen locker zusammengefügt Gewebekomponenten darstellt. [27] Unter vielen inflammatorischen Zuständen steigt die Gewebekonzentration an HA an, so zum Beispiel bei Patienten mit Sarkoidose oder idiopathischer Lungenfibrose. Hier kann – korreliert mit der Intensität der Alveolitis und dem klinischen Schweregrad – eine erhöhte HA-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) festgestellt werden. [56] [11] [10] [39] Während einer akuten Episode der Farmerlungenkrankheit können in der BAL ebenfalls erhöhte HA-Werte in Abhängigkeit vom Schweregrad der Alveolitis festgestellt werden, [9] wohingegen die Vermeidung des Kontakts mit schimmeligem Pflanzenmaterialien einen kontinuierlichen Abfall der initial erhöhten HA-Konzentrationen in der BAL bewirkt. [8] Auch im Tiermodell der bleomycininduzierten Lungenschädigung bei Ratten, die mit einem interstitiellen Ödem und konsekutiver fibrotischer Reparatur einhergeht, sammelt sich während der alveolitischen Phase eine beträchtliche Menge von hochmolekularem HA im ödematösen interstitiellen Alveolarraum an. [106] [107] [139]

Die Abstoßungsreaktion von transplantierten Organen ist eine relativ klar definierte „autoimmune“ Entzündung, in welcher der exakte Zeitpunkt der Immunisierung genau bekannt ist und die Entzündungsreaktion – wenn sie nicht medikamentös unterdrückt wird – bis zur Zerstörung des Organs fortschreitet. Ein Frühphänomen der Transplantatabstoßung ist die Entwicklung eines Gewebeödems, das mit Fortschreiten des Abstoßungsprozesses an Größe zunimmt. Sehr früh nach Transplantation reagiert der Empfänger auf die Alloantigene mit einer Aktivierung des Immunsystems und einer Entzündungsreaktion, im Zuge derer es zu einer Neosynthese von großen Mengen an Zytokinen im Transplantat kommt. Mehrere dieser Zytokine wie

IL-1 und TNF α haben eine direkte Wirkung auf mesenchymale Zellen. [48] So ist es wenig verwunderlich, dass im Tiermodell (heterotope allogene Rattenherztransplantation) eine progressive HA-Ansammlung in den Transplantaten bereits zwei Tage nach Transplantation beginnt und sehr hohe Level erreicht, wenn das Organ nekrotisch wird. Sechs Tage nach Transplantation steigt die HA-Konzentration im Transplantat auf Level, die mehr als dreimal so hoch sind, verglichen mit dem eigenen Organ. [57] Auch bei der experimentellen Myokarditis im Mausmodell [147] und dem experimentell ausgelösten Myokardinfarkt kommt es zu einer verstärkten Ansammlung von HA im Gewebe. [148]

Bei der Wundheilung kommt es ebenfalls zum vermehrten Anfall von HA. Es gilt als gut gesichert, dass sich eine erhöhte HA-Konzentration im Gewebe vor allem in der Frühphase der Wundheilung beobachten lässt, [112] [149] wohingegen sie nach ein paar Tagen absinkt und dann vermehrt sulfatierte Glykosaminoglykane vorliegen. [48]

Auch MC zeigen in Kultur eine erhöhte HA-Syntheserate nach Verletzung: Nach mehrfachem Kratzen mit einem Glasstab über konfluente MC-Kulturen kann eine erhöhte Expression der HAS-2 sowie ein Anstieg der HA-Produktion (durch Markierung mit ^3H) festgestellt werden. Die HA-Produktion ist in Zellen die sich im Gebiet des Verletzungsrandes befinden am größten. Exogen zugegebenes HA beschleunigt den Verschluss der Verletzung im Zellrasen. [156]

Verschiedene exogen zugeführte Zytokine steigern ebenfalls die HA-Synthese in MC. Während IL-6, TNF α , TGF β und PDGF-bb nur einen relativ moderaten Effekt haben, induziert IL-1 β einen dramatischen Anstieg der HA-Produktion um das 8fache gegenüber den nichtstimulierten Zellen bei einer IL-1 β -Konzentration von 10 ng/ml. Mit dem Einsatz eines IL-1 β -Rezeptorantagonisten lässt sich dieser Effekt unterbinden. Dass dieses auch im peritonitischen Geschehen eine Rolle spielt, konnte in der zitierten Arbeit ebenfalls geklärt

werden: Während das Dialysat von Patienten, die gerade eine peritonitische Episode erleiden, die HA-Synthese in damit inkubierten MC steigert, läßt sich durch Einsatz eines IL-1 β -Rezeptorantagonisten dieser Effekt unterdrücken. [154]

Wie bereits erwähnt, induziert HA selbst auch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen: Die Inkubation mit HA-Fragmenten steigert die Produktion von MCP-1 und IL-8. Interessanterweise treten diese Effekte nur bei HA-Fragmentgrößen von 1×10^5 bis 7×10^5 Dalton auf. [59] In der vorliegenden Arbeit kam ausschließlich hochmolekulares HA größeren Molekulargewichts zum Einsatz. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass entzündliche Prozesse über freie Sauerstoffradikale zu einer Degradation (und damit verkleinerten Molekülgröße) von HA führen. [54] [48]

Welche Rolle spielt nun HA in inflammatorischen Prozessen? Möglicherweise schützt eine HA-Schicht Zellen vor viralen Infektionen [23] und zytotoxischen Effekten durch Lymphozyten. [45] [94]

Darüber hinaus trägt HA zum einen aber durch seine osmotische Wirkung sicher auch zur Entwicklung einer „Überwässerung“ des Gewebes und damit zum Ödem in der Frühphase von Entzündung und Wundheilung bei. [57] [48] Zum anderen stimuliert HA die Synthese von IL-1 β , TNF α und IGF-1 in Makrophagen, die als Zytokine und Wachstumsfaktoren in entzündlichen und reparativen Prozessen eine Rolle spielen. [108] Und außerdem vermittelt HA Zellmigration von lymphoiden Zellen, in welcher der RHAMM-Rezeptor eine Rolle spielt. Dieser Rezeptor trägt zu einer schnellen Migration über HA-bedeckte Oberflächen bei. [48]

6.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Wie schon oben erwähnt, gibt es Bestrebungen, HA der PD-Lösung beizufügen. Dies steht vor dem Hintergrund von Arbeiten, die zeigten, dass sich in Tierversuchen durch intraperitoneale HA-Gabe die peritoneale Flüssigkeitsabsorptionsrate vermindern ließ, [55] [118] wodurch eine verbesserte Ultrafiltrationsleistung der Peritonealmembran erzielt werden konnte. Ebenso wurde im Tierversuch eine verminderte Permeabilität für Albumin und Gesamteiweiß und eine tendenziell erhöhte Clearance der kleinen Moleküle (Kreatinin und Harnstoff) unter HA-Gabe beobachtet. [118] Auch eine Veränderung inflammatorischer Marker unter HA-Behandlung wurde beschrieben: Trotz gleicher peritonealer Zellzahlen hatten die mit HA-Lösung behandelten Tiere eine geringere Prozentzahl neutrophiler Granulozyten als die Vergleichspopulation. Ebenso traten die proinflammatorischen Zytokine MCP-1 und TNF α im Dialysat in signifikant niedrigerer Konzentration auf. Im Gegensatz dazu konnte dieselbe Gruppe unter LPS-induzierter Peritonitis keine Änderung von Zellzahl und Zytokinproduktion unter HA-Behandlung feststellen. [19]

Die Anwendung von HA am Menschen in der Peritonealdialyse ist bisher nicht beschrieben. Allerdings gibt es Arbeiten, die belegen dass in PD-Patienten die HA-Konzentration im Dialyseeffluat während Peritonitis und proportional zur Zeit an der PD ansteigt. [153] Wenn HA nun positive Effekte auf die Membranfunktion hat, liegt es nahe, dieses zu substituieren bzw. die Konzentration im Peritoneum durch exogene Gabe zu erhöhen, da HA sehr leicht von der peritonealen Oberfläche abgewaschen werden kann, was durch die PD-Behandlung vermutlich geschieht. [55]

In Tierversuchen wurde bisher Konzentrationen von bis zu 10 mg/dL eingesetzt. [20] [118] Darunter wurden auch die oben beschriebenen, positiven Effekte auf die Membranfunktion gesehen. Was das fibrinolytische System betrifft, so ließen sich in der vorliegenden Arbeit bei dieser Konzentration lediglich

Diskussion

tendenzielle Veränderungen feststellen. Der Abfall von t-PA und der Anstieg von PAI-1 wurde erst bei einer Konzentration von 50 mg/dL signifikant. In diesem Zusammenhang steht der Anwendung von HA als Zugabe zur PD-Lösung in niedrigeren Konzentrationen also nichts im Wege. Allerdings sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass HA immer wieder im Kontext von inflammatorischen Prozessen und Wundheilung genannt wird und die Rolle, die es dabei spielt, noch relativ unklar ist. Insofern sollten vor einem Einsatz von HA in der menschlichen Peritonealhöhle noch weitere Untersuchungen angestrebt werden – nicht zuletzt um die pathogenetischen Zusammenhänge im Umfeld von Entzündung und Wundheilung besser zu verstehen.

7. Zusammenfassung

Die Peritonealdialyse ist neben der Hämodialyse ein häufig genutztes Verfahren zur Nierenersatztherapie. Diese Methode wird jedoch oft durch intraperitoneale Fibrinablagerungen verschiedener Ursachen (gravierende homöostatische Störungen, Peritonitiden, Fremdmaterialien, ...) eingeschränkt. Wesentlich in der Pathogenese solcher Ablagerungen sind Störungen des fibrinolytischen Gleichgewichts. Mesothelzellen synthetisieren mit t-PA und PAI-1 die Faktoren, deren Gleichgewicht in der Peritonealhöhle für ein stabiles Niveau zwischen Fibrinbildung und Fibrinabbau essentiell ist. Mesothelzellen sind somit unmittelbar und entscheidend an der Entstehung von intraperitonealen Fibrinablagerungen beteiligt.

Im Tierversuch zeigte die Beifügung von Hyaluronan zur Dialyseflüssigkeit positive Effekte hinsichtlich der Membranfunktion des Peritoneums. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit der Effekt von Hyaluronan auf die Synthese von t-PA und PAI-1 an primären humanen Mesothelzellen untersucht:

- Sowohl im Northern Blot als auch im ELISA zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Abfall der t-PA Synthese, der ab einer HA Konzentration von 50 mg/dL signifikant wurde.
- Für die Produktion von PAI-1 ließ sich im ELISA eine konzentrationsabhängige Steigerung (signifikant ab 50 mg/dL) nachweisen, die jedoch auf mRNA-Ebene nicht nachvollzogen werden konnte.
- Die beschriebenen Ergebnisse ließen sich durch den Einsatz von Hyaluronsäure eines anderen Herstellers reproduzieren. Somit erscheint ein Effekt durch kontaminierte HA unwahrscheinlich.

Im Northern Blot wurde darüber hinaus die mRNA-Expression von LRP bestimmt – einem Rezeptor, der eine Schlüsselposition für die Internalisation und Degradation von t-PA in Mesothelzellen einnimmt. Bei gleichbleibenden mRNA-Mengen für LRP unter Stimulation mit HA kann jedoch eine Internalisierung und Degradation von t-PA als Mit-/Ursache des HA-induzierten Abfalles weitestgehend ausgeschlossen werden.

Es folgten Untersuchungen zur Klärung des Mechanismus, über den die hyaluronaninduzierten Veränderungen der mesothelialen Synthese von t-PA und PAI-1 vermittelt sind:

- Die Blockade des HA-Rezeptors CD44 mittels eines monoklonalen Antikörpers veränderte die für HA beschriebenen Effekte nicht.

Als weitere, für HA an Mesothelzellen in diversen Arbeiten bereits beschriebene Signaltransduktionswege, wurden sowohl die ERK1/ERK2 Kaskade, als auch die SAPK2/p38 Kaskade mittels spezifischer Inhibitoren untersucht:

- Lediglich der Inhibitor für den SAPK2/p38 Weg war in der Lage, den HA-induzierten Abfall von t-PA signifikant abzuschwächen.
- Der HA-bedingte PAI-1 Anstieg konnte durch keinen der eingesetzten Inhibitoren beeinflusst werden.

Die beschrittenen Mechanismen der HA-induzierten Veränderungen für die mesotheliale t-PA und PAI-1-Synthese bleiben somit weitgehend ungeklärt. Die zur Erzielung signifikanter Effekte erforderlichen hohen HA-Konzentrationen, die fehlende Beteiligung des CD44 Rezeptors sowie die Mitbeteiligung des SAPK2/p38 Weges weisen auf osmotische und/oder Viskositätseffekte als eine mögliche Ursache hin.

Zusammenfassung

Bezüglich einer klinischen Anwendung von Hyaluronan als Dialyseflüssigkeits-Adjuvans zur Verbesserung der Membraneigenschaften lassen die hier dargestellten Ergebnisse den Schluss zu, dass niedrige Konzentrationen die mesotheliale Regulierung des Fibrinolyse-Systems nicht beeinträchtigen, jedoch auch keinen positiven Effekt haben. Der Einsatz von höheren Konzentrationen ist jedoch vor dem Hintergrund der beschriebenen Ergebnisse abzulehnen.

Insgesamt sollte nicht vergessen werden, dass Hyaluronan sowohl in Wundheilungs-, wie auch in inflammatorischen und fibrotischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt, und die Anwendung in einem so sensiblen Umfeld wie dem menschlichen Peritonealraum wohl überlegt sein sollte.

8. Literaturverzeichnis

1. Abe H, Rodgers KE, Ellefson D, diZerega GS: Kinetics of interleukin-1 and tumor necrosis factor secretion by rabbit macrophages recovered from the peritoneal cavity after surgery. *J Invest Surg* 4:141-151, 1991
2. Andreasen PA, Sottrup-Jensen L, Kjoller L, Nykjaer A, Moestrup SK, Petersen CM, Gliemann J: Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett* 338:239-245, 1994
3. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B: CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303-1313, 1990
4. Badia JM, Whawell SA, Scott-Coombes DM, Abel PD, Williamson RC, Thompson JN: Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br J Surg* 83:347-348, 1996
5. Bailie GR, Eisele G: Continuous ambulatory peritoneal dialysis: a review of its mechanics, advantages, complications, and areas of controversy. *Ann Pharmacother* 26:1409-1420, 1992
6. Bazzato G, Fracasso A, Gambaro G, Baggio B: Use of glycosaminoglycans to increase efficiency of long-term continuous peritoneal dialysis. *Lancet* 346:740-741, 1995
7. Beck-Schimmer B, Oertli B, Pasch T, Wuthrich RP: Hyaluronan induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 9:2283-2290, 1998
8. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hallgren R: Bronchoalveolar mastocytosis in farmer's lung is related to the disease activity. *Arch Intern Med* 148:1362-1365, 1988
9. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hallgren R: Hyaluronate and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid as markers of disease activity in farmer's lung. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295:803-806, 1987
10. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Thunell M, Hallgren R: Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis: relationship to lavage mast cells. *Thorax* 42:933-938, 1987

11. Bjermer L, Lundgren R, Hallgren R: Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 44:126-131, 1989
12. Bos HJ, Meyer F, de Veld JC, Beelen RH: Peritoneal dialysis fluid induces change of mononuclear phagocyte proportions. *Kidney Int* 36:20-26, 1989
13. Bosworth N AG: The eosinophil content of the peritoneal cavity of the rat. *Aust J Exp Biol Med Sci* 39:165-170, 1961
14. Bothner H, Wik O: Rheology of hyaluronate. *Acta Otolaryngol Suppl* 442:25-30, 1987
15. Breborowicz A, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wieczorowska-Tobis K, Wisniewska J, Tam P, French I, Wu G: The effect of N-acetylglucosamine as a substrate for in vitro synthesis of glycosaminoglycans by human peritoneal mesothelial cells and fibroblasts. *Adv Perit Dial* 14:31-35, 1998
16. Breborowicz A, Oreopoulos DG: Biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. *Am J Kidney Dis* 27:738-743, 1996
17. Breborowicz A, Oreopoulos DG: Evidence for the presence of chronic inflammation during peritoneal dialysis: therapeutic implications. *Perit Dial Int* 17 Suppl 2:S37-41, 1997
18. Breborowicz A, Oreopoulos DG: Physiological approaches to increase biocompatibility of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 15:S76-85; discussion S85-76, 1995
19. Breborowicz A, Polubinska A, Moberly J, Ogle K, Martis L, Oreopoulos D: Hyaluronan modifies inflammatory response and peritoneal permeability during peritonitis in rats. *Am J Kidney Dis* 37:594-600, 2001
20. Breborowicz A, Polubinska A, Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Moberly J, Martis L, Oreopoulos D: Intraperitoneal hyaluronan administration in conscious rats: absorption, metabolism, and effects on peritoneal fluid dynamics. *Perit Dial Int* 21:130-135, 2001
21. Buckman RF, Woods M, Sargent L, Gervin AS: A unifying pathogenetic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions. *J Surg Res* 20:1-5, 1976
22. Chan MK, Chow L, Lam SS, Jones B: Peritoneal eosinophilia in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis: a prospective study. *Am J Kidney Dis* 11:180-183, 1988

23. Clarris BJ, Fraser JR: On the pericellular zone of some mammalian cells in vitro. *Exp Cell Res* 49:181-193, 1968
24. Cliff WJ, Grobety J, Ryan GB: Postoperative pericardial adhesions. The role of mild serosal injury and spilled blood. *J Thorac Cardiovasc Surg* 65:744-750, 1973
25. Cohen P: The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 7:353-361, 1997
26. Collen D, Lijnen HR: Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78:3114-3124, 1991
27. Comper WD, Laurent TC: Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* 58:255-315, 1978
28. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC: SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364:229-233, 1995
29. Davila RM, Crouch EC: Role of mesothelial and submesothelial stromal cells in matrix remodeling following pleural injury. *Am J Pathol* 142:547-555, 1993
30. Dawney A: Advanced glycation end products in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 16 Suppl 1:S50-53, 1996
31. Di Paolo N, Garosi G, Petrini G, Traversari L, Rossi P: Peritoneal dialysis solution biocompatibility testing in animals. *Perit Dial Int* 15:S61-69; discussion S69-70, 1995
32. Di Paolo N, Sacchi G, De Mia M, Gaggiotti E, Capotondo L, Rossi P, Bernini M, Pucci AM, Ibba L, Sabatelli P, et al.: Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 44:204-211, 1986
33. Digenis: Anatomy of the peritoneal membrane. *Peritoneal Dialysis Bullertin* 3:63-69, 1984
34. Dobbie JW: Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif* 7:74-85, 1989
35. Dobbie JW: Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 12:14-27, 1992

36. Dobbie JW: Serositis: comparative analysis of histological findings and pathogenetic mechanisms in nonbacterial serosal inflammation. *Perit Dial Int* 13:256-269, 1993
37. Dobbie JW: Ultrastructure and pathology of the peritoneum in peritoneal dialysis, in *The Textbook of Peritoneal Dialysis*, edited by Gokal R NK, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994, pp 17-44
38. Doherty NS, Griffiths RJ, Hakkinen JP, Scampoli DN, Milici AJ: Post-capillary venules in the "milky spots" of the greater omentum are the major site of plasma protein and leukocyte extravasation in rodent models of peritonitis. *Inflamm Res* 44:169-177, 1995
39. Eklund A, Hallgren R, Blaschke E, Engstrom-Laurent A, Persson U, Svane B: Hyaluronate in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis and its relationship to alveolar cell populations. *Eur J Respir Dis* 71:30-36, 1987
40. Ellis H: The aetiology of post-operative abdominal adhesions. An experimental study. *Br J Surg* 50:10-16, 1962
41. Entwistle J, Hall CL, Turley EA: HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem* 61:569-577, 1996
42. Farthmann EH, Schoffel U: Epidemiology and pathophysiology of intraabdominal infections (IAI). *Infection* 26:329-334, 1998
43. Fischereder M, Luckow B, Sitter T, Schroppel B, Banas B, Schlondorff D: Immortalization and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 51:2006-2012, 1997
44. Fotev Z, Whitaker D, Papadimitriou JM: Role of macrophages in mesothelial healing. *J Pathol* 151:209-219, 1987
45. Fraser JR, Clarris BJ: On the reactions of human synovial cells exposed to homologous leucocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 6:211-225, 1970
46. Ganter: Über die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blute durch Dialyse, in *Münchener Medizinische Wochenschrift* (vol 70), 1923, pp 1478-1480
47. Genestier S, Hedelin G, Schaffer P, Faller B: Prognostic factors in CAPD patients: a retrospective study of a 10-year period. *Nephrol Dial Transplant* 10:1905-1911, 1995
48. Gerdin B, Hallgren R: Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *J Intern Med* 242:49-55, 1997

49. Gibbs DA, Merrill EW, Smith KA, Balazs EA: Rheology of hyaluronic acid. *Biopolymers* 6:777-791, 1968
50. Gibson FC, 3rd, Onderdonk AB, Kasper DL, Tzianabos AO: Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*. *J Immunol* 160:5000-5006, 1998
51. Gleich GJ, Loegering D: Selective stimulation and purification of eosinophils and neutrophils from guinea pig peritoneal fluids. *J Lab Clin Med* 82:522-528, 1973
52. Goedde M, Sitter T, Schiffel H, Bechtel U, Schramm W, Spannagl M: Coagulation- and fibrinolysis-related antigens in plasma and dialysate of CAPD patients. *Perit Dial Int* 17:162-166, 1997
53. Gotloib L, Shostak A: Endocytosis and transcytosis of albumin gold through mice peritoneal mesothelium. *Kidney Int* 47:1274-1284, 1995
54. Greenwald RA: Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin Arthritis Rheum* 20:219-240, 1991
55. Guo QY, Peng WX, Cheng HH, Ye RG, Lindholm B, Wang T: Hyaluronan preserves peritoneal membrane transport properties. *Perit Dial Int* 21:136-142, 2001
56. Hallgren R, Eklund A, Engstrom-Laurent A, Schmekel B: Hyaluronate in bronchoalveolar lavage fluid: a new marker in sarcoidosis reflecting pulmonary disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290:1778-1781, 1985
57. Hallgren R, Gerdin B, Tengblad A, Tufveson G: Accumulation of hyaluronan (hyaluronic acid) in myocardial interstitial tissue parallels development of transplantation edema in heart allografts in rats. *J Clin Invest* 85:668-673, 1990
58. Han F, Ishiguro N, Ito T, Sakai T, Iwata H: Effects of sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis in rabbit knee joints. *Nagoya J Med Sci* 62:115-126, 1999
59. Haslinger B, Mandl-Weber S, Sellmayer A, Sitter T: Hyaluronan fragments induce the synthesis of MCP-1 and IL-8 in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res* 305:79-86, 2001
60. Heickendorff L, Ledet T, Rasmussen LM: Glycosaminoglycans in the human aorta in diabetes mellitus: a study of tunica media from areas with and without atherosclerotic plaque. *Diabetologia* 37:286-292, 1994

61. Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A, Tranaeus A, Lindholm B: Peritoneal transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int* 38:495-506, 1990
62. Heldin P, Pertoft H: Synthesis and assembly of the hyaluronan-containing coats around normal human mesothelial cells. *Exp Cell Res* 208:422-429, 1993
63. Heldin P, Suzuki M, Teder P, Pertoft H: Chondroitin sulfate proteoglycan modulates the permeability of hyaluronan-containing coats around normal human mesothelial cells. *J Cell Physiol* 165:54-61, 1995
64. Hertzler: *The Peritoneum*. St. Louis, CV Mosby Co, 1919
65. Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK: Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 7:4119-4127, 1988
66. Holmdahl L: The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur J Surg Suppl*:24-31, 1997
67. Holmdahl L, al-Jabreen M, Risberg B: Experimental models for quantitative studies on adhesion formation in rats and rabbits. *Eur Surg Res* 26:248-256, 1994
68. Holmdahl L, Al-Jabreen M., Risberg B.: The role of the fibrinolysis in the formation of post-operative adhesions. *Wound Rep Reg* 7:171-176, 1994
69. Holmdahl L, Al-Jabreen M., Xia G., Risberg B.: The impact of starch-powdered gloves on the formation of adhesions in rats. *Eur J Surg* 160:257-261, 1994
70. Horn IR, van den Berg BM, Moestrup SK, Pannekoek H, van Zonneveld AJ: Plasminogen activator inhibitor 1 contains a cryptic high affinity receptor binding site that is exposed upon complex formation with tissue-type plasminogen activator. *Thromb Haemost* 80:822-828, 1998
71. Horton MR, Olman MA, Bao C, White KE, Choi AM, Chin BY, Noble PW, Lowenstein CJ: Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L707-715, 2000
72. Ince A, Eroglu A, Tarhan O, Bulbul M: Peritoneal fibrinolytic activity in peritonitis. *Am J Surg* 183:67-69, 2002

73. Jacobson A, Brinck J, Briskin MJ, Spicer AP, Heldin P: Expression of human hyaluronan synthases in response to external stimuli. *Biochem J* 348 Pt 1:29-35, 2000
74. Jain M, He Q, Lee WS, Kashiki S, Foster LC, Tsai JC, Lee ME, Haber E: Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury. *J Clin Invest* 98:877, 1996
75. James DC, Ellis H, Hugh TB: The effect of streptokinase on experimental intraperitoneal adhesion formation. *J Pathol Bacteriol* 90:279-287, 1965
76. Jorres A, Gahl GM, Frei U: In vitro studies on the effect of dialysis solutions on peritoneal leukocytes. *Perit Dial Int* 15:S41-45; discussion S45-46, 1995
77. Jörres A LK, Lang J, Sander K, Gahl GM, Williams JD, Topley N: Human peritoneal fibroblasts synthesize IL-6 in response to IL-1b and TNFa (Abstract). *Nephrology Dialysis Transplantation* 8:1023, 1993
78. Jörres A LK, Topley N, Lang J, Sander K, Williams JD, Gahl GM, Frei U: Human peritoneal fibroblast synthesize the chemotactic peptid interleukin-8 (abstract). *Nephrology Dialysis Transplantation* 9:1022, 1994
79. Kruithof EK, Gudinchet A, Bachmann F: Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various disease states. *Thromb Haemost* 59:7-12, 1988
80. Laurent C, Johnson-Wells G, Hellstrom S, Engstrom-Laurent A, Wells AF: Localization of hyaluronan in various muscular tissues. A morphological study in the rat. *Cell Tissue Res* 263:201-205, 1991
81. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR: The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 74:A1-7, 1996
82. LeBoeuf RD, Gregg RR, Weigel PH, Fuller GM: Effects of hyaluronic acid and other glycosaminoglycans on fibrin polymer formation. *Biochemistry* 26:6052-6057, 1987
83. LeBoeuf RD, Raja RH, Fuller GM, Weigel PH: Human fibrinogen specifically binds hyaluronic acid. *J Biol Chem* 261:12586-12592, 1986
84. Lee JY, Spicer AP: Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol* 12:581-586, 2000
85. Liberek T, Topley N, Jorres A, Coles GA, Gahl GM, Williams JD: Peritoneal dialysis fluid inhibition of phagocyte function: effects of

- osmolality and glucose concentration. *J Am Soc Nephrol* 3:1508-1515, 1993
86. Liebman SM, Langer JC, Marshall JS, Collins SM: Role of mast cells in peritoneal adhesion formation. *Am J Surg* 165:127-130, 1993
87. Lindor LJ, Loegering DA, Wassom DL, Gleich GJ: Recovery of eosinophils from the peritoneal cavity of the guinea pig. *J Immunol Methods* 41:125-134, 1981
88. Luijendijk RW, de Lange DC, Wauters CC, Hop WC, Duron JJ, Pailler JL, Campronon BR, Holmdahl L, van Geldorp HJ, Jeekel J: Foreign material in postoperative adhesions. *Ann Surg* 223:242-248, 1996
89. Mactier RA: The spectrum of peritoneal fibrosing syndromes in peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 16:223-228, 2000
90. Mahiout A BR: Human mesothelial cells produce a 72 kD-gelatinase during exposure to advanced glycosylated (AGE) collagen. *Perit Dial Int* 15:11, 1995
91. Mandl-Weber S, Haslinger B, Schalkwijk CG, Sitter T: Early glycated albumin, but not advanced glycated albumin, methylglyoxal, or 3-deoxyglucosone increases the expression of PAI-1 in human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 21:487-494, 2001
92. Marshall BC, Santana A, Xu QP, Petersen MJ, Campbell EJ, Hoidal JR, Welgus HG: Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. Cellular differentiation influences expression. *J Clin Invest* 91:1792-1799, 1993
93. Marutsuka K, Woodcock-Mitchell J, Sakamoto T, Sobel BE, Fujii S: Pathogenetic implications of hyaluronan-induced modification of vascular smooth muscle cell fibrinolysis in diabetes. *Coron Artery Dis* 9:177-184, 1998
94. McBride WH, Bard JB: Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 149:507-515, 1979
95. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW: Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* 98:2403-2413, 1996
96. Medcalf JF, Walls J, Pawluczyk IZ, Harris KP: Effects of glucose dialysate on extracellular matrix production by human peritoneal

- mesothelial cells (HPMC): the role of TGF-beta. *Nephrol Dial Transplant* 16:1885-1892, 2001
97. Metcalfe DD: Mast cell mediators with emphasis on intestinal mast cells. *Ann Allergy* 53:563-575, 1984
98. Michailova KN: A combined electron microscopic investigation of the peritoneal mesothelium in the rat. *Eur J Morphol* 33:265-277, 1995
99. Milligan SA, Owens MW, Henderson RJ, Jr., Grimes SR, Jr.: Characterization of proteoglycans produced by rat pleural mesothelial cells in vitro. *Exp Lung Res* 21:559-575, 1995
100. Morris ER, Rees DA, Welsh EJ: Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions. *J Mol Biol* 138:383-400, 1980
101. Muijsken MA, Heezius HJ, Verhoef J, Verbrugh HA: Role of mesothelial cells in peritoneal antibacterial defence. *J Clin Pathol* 44:600-604, 1991
102. Nagy JA: Peritoneal membrane morphology and function. *Kidney Int Suppl* 56:S2-11, 1996
103. Naiki Y, Maeda Y, Matsuo K, Yonekawa S, Sakaguchi M, Iwamoto I, Hasegawa H, Kanamaru A: Involvement of TGF-beta signal for peritoneal sclerosing in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Nephrol* 16:95-102, 2003
104. Narita M, Bu G, Herz J, Schwartz AL: Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo. *J Clin Invest* 96:1164-1168, 1995
105. Nehls V, Hayen W: Are hyaluronan receptors involved in three-dimensional cell migration? *Histol Histopathol* 15:629-636, 2000
106. Nettelbladt O, Bergh J, Schenholm M, Tengblad A, Hallgren R: Accumulation of hyaluronic acid in the alveolar interstitial tissue in bleomycin-induced alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 139:759-762, 1989
107. Nettelbladt O, Hallgren R: Hyaluronan (hyaluronic acid) in bronchoalveolar lavage fluid during the development of bleomycin-induced alveolitis in the rat. *Am Rev Respir Dis* 140:1028-1032, 1989
108. Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DW: Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest* 91:2368-2377, 1993

109. Nolph: The Textbook of Peritoneal Dialysis, in, edited by Gokal R NK, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1994, pp 17-44
110. Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ: Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6776-6780, 1986
111. Oertli B, Fan X, Wuthrich RP: Characterization of CD44-mediated hyaluronan binding by renal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 13:271-278, 1998
112. Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, Larjava H: Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 43:125-135, 1995
113. Orth K, Willnow T, Herz J, Gething MJ, Sambrook J: Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 269:21117-21122, 1994
114. Otter M, Barrett-Bergshoeff MM, Rijken DC: Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor. *J Biol Chem* 266:13931-13935, 1991
115. Owens MW, Grimes SR: Pleural mesothelial cell response to inflammation: tumor necrosis factor-induced mitogenesis and collagen synthesis. *Am J Physiol* 265:L382-388, 1993
116. Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld AJ, van Mourik JA: Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *Embo J* 5:2539-2544, 1986
117. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D: Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301:214-221, 1983
118. Polubinska A, Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wieczorowska-Tobis K, Chen C, Moberly JB, Martis L, Breborowicz A, Oreopoulos DG: Dialysis solution containing hyaluronan: effect on peritoneal permeability and inflammation in rats. *Kidney Int* 57:1182-1189, 2000

119. Raftery AT: Effect of peritoneal trauma on peritoneal fibrinolytic activity and intraperitoneal adhesion formation. An experimental study in the rat. *Eur Surg Res* 13:397-401, 1981
120. Raghov R: The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *Faseb J* 8:823-831, 1994
121. Reijnen MM, Holmdahl L, Kooistra T, Falk P, Hendriks T, van Goor H: Time course of peritoneal tissue plasminogen activator after experimental colonic surgery: effect of hyaluronan-based antiadhesive agents and bacterial peritonitis. *Br J Surg* 89:103-109, 2002
122. Reijnen MM, van Goor H, Falk P, Hedgren M, Holmdahl L: Sodium hyaluronate increases the fibrinolytic response of human peritoneal mesothelial cells exposed to tumor necrosis factor alpha. *Arch Surg* 136:291-296, 2001
123. Rennard SI, Jaurand MC, Bignon J, Kawanami O, Ferrans VJ, Davidson J, Crystal RG: Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung. *Am Rev Respir Dis* 130:267-274, 1984
124. Renvall S, Lehto M, Penttinen R: Development of peritoneal fibrosis occurs under the mesothelial cell layer. *J Surg Res* 43:407-412, 1987
125. Rigby RJ, Hawley CM: Sclerosing peritonitis: the experience in Australia. *Nephrol Dial Transplant* 13:154-159, 1998
126. Ross JA, Ansell I, Hjelle JT, Anderson JD, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW: Phenotypic mapping of human mesothelial cells. *Adv Perit Dial* 14:25-30, 1998
127. Rubin J, Clawson M, Planch A, Jones Q: Measurements of peritoneal surface area in man and rat. *Am J Med Sci* 295:453-458, 1988
128. Savani RC, Wang C, Yang B, Zhang S, Kinsella MG, Wight TN, Stern R, Nance DM, Turley EA: Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J Clin Invest* 95:1158-1168, 1995
129. Scott JE, Cummings C, Brass A, Chen Y: Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J* 274 (Pt 3):699-705, 1991

130. Scully MF, Kakkar VV, Goodwin CA, O'Regan M: Inhibition of fibrinolytic activity by hyaluronan and its alcohol ester derivatives. *Thromb Res* 78:255-258, 1995
131. Simionescu M, Simionescu N: Organization of cell junctions in the peritoneal mesothelium. *J Cell Biol* 74:98-110, 1977
132. Sitter T, Spannagl M, Schiffl H, Held E, van Hinsbergh VW, Kooistra T: Imbalance between intraperitoneal coagulation and fibrinolysis during peritonitis of CAPD patients: the role of mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 10:677-683, 1995
133. Sitter T, Toet K, Fricke H, Schiffl H, Held E, Kooistra T: Modulation of procoagulant and fibrinolytic system components of mesothelial cells by inflammatory mediators. *Am J Physiol* 271:R1256-1263, 1996
134. Sitter T, Toet K, Quax P, Kooistra T: Fibrinolytic activity of human mesothelial cells is counteracted by rapid uptake of tissue-type plasminogen activator. *Kidney Int* 55:120-129, 1999
135. Strickland DK, Kounnas MZ, Argraves WS: LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *Faseb J* 9:890-898, 1995
136. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD: Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 37:1563-1570, 1990
137. Suassuna JH, Das Neves FC, Hartley RB, Ogg CS, Cameron JS: Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD. *Kidney Int* 46:443-454, 1994
138. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D: The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7:182-190, 1999
139. Teder P, Nettelbladt O, Heldin P: Characterization of the mechanism involved in bleomycin-induced increased hyaluronan production in rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:181-189, 1995
140. Thompson JN, Paterson-Brown S, Harbourne T, Whawell SA, Kalodiki E, Dudley HA: Reduced human peritoneal plasminogen activating

- activity: possible mechanism of adhesion formation. *Br J Surg* 76:382-384, 1989
141. Tsukada K, Katoh H, Shiojima M, Suzuki T, Takenoshita S, Nagamachi Y: Concentrations of cytokines in peritoneal fluid after abdominal surgery. *Eur J Surg* 159:475-479, 1993
142. Valle MT, Degl'Innocenti ML, Bertelli R, Facchetti P, Perfumo F, Fenoglio D, Kunkl A, Gusmano R, Manca F: Antigen-presenting function of human peritoneum mesothelial cells. *Clin Exp Immunol* 101:172-176, 1995
143. van den Berg EA, Sprengers ED, Jaye M, Burgess W, Maciag T, van Hinsbergh VW: Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 60:63-67, 1988
144. van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van Bockel J, van Muijen GN: Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 75:1490-1497, 1990
145. van Zonneveld AJ, Chang GT, van den Berg J, Kooistra T, Verheijen JH, Pannekoek H, Kluft C: Quantification of tissue-type plasminogen activator (t-PA) mRNA in human endothelial-cell cultures by hybridization with a t-PA cDNA probe. *Biochem J* 235:385-390, 1986
146. Vipond MN, Whawell SA, Thompson JN, Dudley HA: Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet* 335:1120-1122, 1990
147. Waldenstrom A, Fohlman J, Ilback NG, Ronquist G, Hallgren R, Gerdin B: Coxsackie B3 myocarditis induces a decrease in energy charge and accumulation of hyaluronan in the mouse heart. *Eur J Clin Invest* 23:277-282, 1993
148. Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hallgren R: Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 88:1622-1628, 1991
149. Weigel PH, Fuller GM, LeBoeuf RD: A model for the role of hyaluronic acid and fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *J Theor Biol* 119:219-234, 1986
150. White K, Granger: *The peritoneal microcirculation in peritoneal dialysis*. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, 1994

151. Wieslander AP: Cytotoxicity of peritoneal dialysis fluid - is it related to glucose breakdown products? *Nephrol Dial Transplant* 11:958-959, 1996
152. Witowski J, Topley N, Jorres A, Liberek T, Coles GA, Williams JD: Effect of lactate-buffered peritoneal dialysis fluids on human peritoneal mesothelial cell interleukin-6 and prostaglandin synthesis. *Kidney Int* 47:282-293, 1995
153. Yamagata K, Tomida C, Koyama A: Intraperitoneal hyaluronan production in stable continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 19:131-137, 1999
154. Yung S, Coles GA, Davies M: IL-1 beta, a major stimulator of hyaluronan synthesis in vitro of human peritoneal mesothelial cells: relevance to peritonitis in CAPD. *Kidney Int* 50:1337-1343, 1996
155. Yung S, Coles GA, Williams JD, Davies M: The source and possible significance of hyaluronan in the peritoneal cavity. *Kidney Int* 46:527-533, 1994
156. Yung S, Thomas GJ, Davies M: Induction of hyaluronan metabolism after mechanical injury of human peritoneal mesothelial cells in vitro. *Kidney Int* 58:1953-1962, 2000
157. Zeillemaker AM, Hoyneck van Papendrecht AA, Roos D: Preferential apical secretion of IL-6 and IL-8 by stimulated human mesothelial cells. *Perit Dial Int* 13:30, 1993
158. Zeillemaker AM, Mul FP, Hoyneck van Papendrecht AA, Kuijpers TW, Roos D, Leguit P, Verbrugh HA: Polarized secretion of interleukin-8 by human mesothelial cells: a role in neutrophil migration. *Immunology* 84:227-232, 1995

Veröffentlichungen und Vorträge

Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung vorab veröffentlicht. Die Veröffentlichung enthält die entsprechenden Hinweise auf diese Dissertation und ist nachfolgend aufgelistet:

Sitter T, Sauter M, Haslinger B
Modulation of fibrinolytic system components in mesothelial cells by hyaluronan.
Perit Dial Int 23: 222-227, 2003

Folgende Arbeit ist zur Publikation eingereicht:

Sauter M, Wörnle M, Cohen C, Mussack T, Sitter T
Captopril attenuates the production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in cultured Human Mesothelial Cells (HMC)

Vorträge:

Sauter M, Wörnle M, Cohen C, Sitter T
ACE inhibitor attenuates VEGF and TGF β production in cultured human peritoneal mesothelial cells

vorgetragen beim:

Kongreß der American Society of Nephrology 2002
in Philadelphia, PA, USA

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Sitter für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Abteilung durchzuführen, für die Überlassung des Themas, für die Arbeitsmöglichkeiten im Labor, für die ausgezeichnete Betreuung bei der Planung und Durchführung der Arbeit und für seine stets fördernde Gesinnung;

Frau Dr. med. Bettina Löffler für die ausgezeichnete Betreuung gerade in der Anfangsphase der Arbeit und für ihre andauernde Unterstützung auch nach ihrem Weggang aus München;

Frau Dr. rer. nat. Sonja Mandl-Weber für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre wertvolle Hilfe im Labor und ihre freundschaftliche Unterstützung;

Allen Mitarbeitern des OP-Teams der Maria-Theresia-Klinik, sowie Herrn Oberarzt Dr. med. Thomas Mussack aus der Chirurgischen Universitätsklinik, für die zuverlässige Bereitstellung von Operationspräparaten des großen Netzes, die für die Isolation von Mesothelzellen benötigt wurden.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Matthias Sauter
Geburtsdatum: 20.07.1977
Geburtsort: Kempten/Allgäu
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1983 – 1987: Grundschule Wiggensbach
1987 – 1996: Allgäu-Gymnasium Kempten

Zivildienst:

1996 – 1997 als Pflegediensthelfer im „Haus Kapellengarten“, Wiggensbach

Studium:

1997 – 2004 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 2004

seit 2000 Anfertigung einer Dissertation am Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Poliklinik- Innenstadt, Klinikum der LMU München unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. T Sitter