

**Immunhistochemischer Nachweis eines lokalen  
Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im  
Peritoneum und dessen Rolle bei der Pathogenese der  
peritonealen Fibrose im Rahmen von Urämie,  
Peritonealdialyse und enkapsulierender  
Peritonealsklerose (EPS)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Lung, Christoph Michael

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. D. Alscher

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Artunc

*If I have seen further it is by standing on the shoulders of giants*

*(Isaac Newton)*

Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System . . . . .	1
1.2	Vitamin D: Wirkungen und Interaktionen . . . . .	7
1.3	Chronische Niereninsuffizienz und Peritonealdialyse (PD) . . . . .	11
1.3.1	Geschichte . . . . .	14
1.3.2	Technik und Verbreitung . . . . .	17
1.3.3	Komplikationen und Langzeitfolgen . . . . .	21
1.4	Enkapsulierende Peritonealsklerose (EPS) . . . . .	27
1.4.1	Epidemiologie . . . . .	27
1.4.2	Diagnostik . . . . .	28
1.4.3	Therapie . . . . .	32
1.5	Fragestellung . . . . .	32
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1	Patientenkollektiv . . . . .	34
2.2	Histologische Bearbeitung . . . . .	35
2.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	35
2.4	Eisenfärbung . . . . .	37
2.5	Immunhistochemische Färbungen . . . . .	38
2.5.1	Technik und Durchführung . . . . .	38
2.5.2	Nachweis von Renin . . . . .	41
2.5.3	Nachweis von Angiotensinogen . . . . .	42
2.5.4	Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1) . . . . .	42
2.5.5	Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2) . . . . .	42
2.5.6	Nachweis des Aldosteron-Rezeptors . . . . .	43
2.5.7	Nachweis des Vitamin D-Rezeptors . . . . .	43
2.5.8	Nachweis von TGF- $\beta$ 1 . . . . .	43
2.5.9	Nachweis von NF $\kappa$ B . . . . .	43
2.6	Semiquantitative Auswertung . . . . .	44

2.6.1	Auswertung der HE-Färbung . . . . .	45
2.6.2	Auswertung der Eisenfärbung . . . . .	46
2.6.3	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen . . . . .	46
2.7	Statistische Aufbereitung . . . . .	48
2.8	Fehlerquellen . . . . .	51
2.9	Dokumentation der Ergebnisse, Flächenberechnung . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Klinische Daten . . . . .	53
3.2	Laborparameter . . . . .	54
3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	55
3.4	Immunhistochemische Ergebnisse . . . . .	57
3.4.1	Nachweis von Renin . . . . .	58
3.4.2	Nachweis von Angiotensinogen . . . . .	64
3.4.3	Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1) . . . . .	79
3.4.4	Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2) . . . . .	83
3.4.5	Nachweis des Aldosteron-Rezeptors . . . . .	92
3.4.6	Nachweis des Vitamin D-Rezeptors . . . . .	99
3.4.7	Nachweis von TGF- $\beta$ 1 . . . . .	108
3.4.8	Nachweis von NF $\kappa$ B . . . . .	117
3.5	Erläuterung zur graphischen Darstellung . . . . .	126
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>127</b>
4.1	Einführung - Stand der Forschung . . . . .	127
4.1.1	Pathophysiologie der EPS . . . . .	127
4.1.2	Die Rolle des RAAS bei der Pathogenese der Peritoneal- fibrose und der EPS - bisherige Erkenntnisse . . . . .	130
4.2	Diskussion der histopathologischen Ergebnisse . . . . .	132
4.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	133
4.2.2	Renin . . . . .	134
4.2.3	Angiotensinogen . . . . .	136

4.2.4	Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1) . . . . .	137
4.2.5	Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2) . . . . .	138
4.2.6	Aldosteron-Rezeptor . . . . .	141
4.2.7	Vitamin D-Rezeptor . . . . .	143
4.2.8	TGF- $\beta$ 1 . . . . .	145
4.2.9	NF $\kappa$ B . . . . .	148
4.3	Diskussion der Laborparameter und klinischen Daten . . . . .	151
4.4	Fazit - Zukunft der EPS in Therapie und Forschung . . . . .	152
<b>Zusammenfassung</b>		<b>154</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>156</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>170</b>
<b>Danksagung</b>		<b>174</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>175</b>

# 1 Einführung

## 1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein bedeutender hormoneller Regelkreis im menschlichen Organismus. Es reguliert durch komplexe gegenseitige Wechselwirkungen den Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers, sowie über verschiedene Mechanismen die langfristige Einstellung des systemischen Blutdruckes. Diese Effekte sind seit geraumer Zeit hinlänglich bekannt und beschrieben. Zur Veranschaulichung des Regelkreises soll Abbildung 1 dienen:

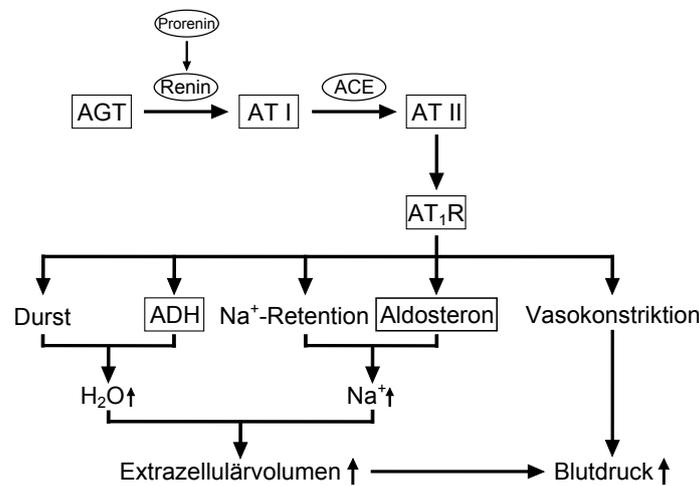


Abb. 1: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.

Ausgangspunkt des Systems ist Renin. Dieses Protein wird in den Juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) der Nierenglomerula synthetisiert, die sich in der Rinde des Nierenparenchyms befinden. Durch die Abspaltung einer n-terminalen Aminosäuresequenz aus seinem Präkursor Prorenin entsteht Renin, welches in Vesikeln der JG-Zellen gespeichert wird. Durch weiter unten beschriebene Sekretionsstimuli wird es in die nahegelegenen, afferenten Arteriolen der Glomerula abgegeben und gelangt daraufhin in den systemischen Kreislauf. Zudem scheint auch eine nicht unerheblich große Menge an Prorenin freigesetzt zu werden, dessen biologische Bedeutung jedoch noch unklar ist [1].

Renin ist eine Endopeptidase, dessen Substrat das in der Leber kontinuierlich

synthetisierte Plasmaprotein Angiotensinogen (AGT) ist. Von diesem Protein wird durch Renin im geschwindigkeitslimitierenden Schritt der RAAS-Kaskade ein n-terminales Dekapeptid abgespaltet, das biologisch inerte Angiotensin I (AT I, auch Ang 1-10). Durch Abspaltung zweier c-terminaler Aminosäuren wird AT I durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) zum biologisch aktiven Metaboliten Angiotensin II (AT II, Ang 1-8) umgesetzt. ACE ist eine membrangebundene Metalloproteinase, welche nahezu ubiquitär endothelial exprimiert wird, in besonders hoher Dichte jedoch in der Lungenstrombahn sowie in der Niere [1].

Die Aufgabe des AT II ist die Regulation des extrazellulären Volumens und des Blutdrucks. Dies geschieht über folgende Mechanismen:

- Resorption von  $\text{Na}^+$ -Ionen im proximalen Nierentubulus
- Stimulation der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde
- Auslösen von Durst und Salzappetit über zentrale Mechanismen
- Stimulation der Sekretion von Vasopressin (ADH) in der Hypophyse

AT II wirkt zudem auf die glatten Gefäßmuskelzellen als starker Vasokonstriktor und steigert dadurch rasch den Gefäßwiderstand und den systemischen Blutdruck, was durch die langsamere Erhöhung des Extrazellulärvolumens unterstützt wird. Seine Wirkungen vermittelt das AT II über spezifische Oberflächenrezeptoren, allen voran über den  $\text{AT}_1$ -Rezeptor ( $\text{AT}_1\text{R}$ ).

Reguliert wird das System über die Freisetzung des Renins. Die wichtigsten Stimuli sind:

- Abfall des Blutdruckes in den afferenten Arteriolen der Nierenkörperchen
- gesteigerter Sympathikotonus über  $\beta_1$ -Rezeptoren der JG-Zellen
- erniedrigte Konzentrationen von  $\text{Cl}^-$ -Ionen an der Macula densa der distalen Nierentubuli

Reduziert wird die Reninfreisetzung durch hohen Blutdruck und Salzüberschuss, sowie über eine negative Rückkopplung durch AT II [1].

Aldosteron ist ein dem AT II nachgeschaltetes Effektormolekül im RAAS. Es handelt sich dabei um ein Steroidhormon, also ein Derivat des Cholesterols, dessen Wirkungen auf der Ebene der Gen-Expression vermittelt werden. Es steigert, nach Bindung an seinen Rezeptor, die Expression von Natrium- und Kalium-Kanälen in den Nierentubuli. Effektiv führt dies zu einer gesteigerten  $\text{Na}^+$ -Retention und  $\text{K}^+$ -Sekretion. Seine Ausschüttung in der Nebennierenrinde wird vor allem wie erwähnt durch AT II sowie durch Hyperkaliämie gesteigert [1].

Das angesprochene Vasopressin, auch Antidiuretisches Hormon (ADH) genannt, ist ein Peptidhormon, welches die Blutosmolarität und das extrazelluläre Volumen durch Wasserretention in den Sammelrohren des Nierenmarks reguliert. Außerdem wirkt es als Vasokonstriktor, vor allem auf die Kapazitätsgefäße. Es wird in neuroendokrinen Zellen des Hypothalamus synthetisiert und über die Neurohypophyse ausgeschüttet. Die Sekretionsstimuli sind erhöhte Osmolarität des Blutes sowie erhöhte AT II-Plasmakonzentrationen [1].

Somit bewerkstelligt das RAAS seine Aufgaben durch verschiedene Mechanismen auf direktem und indirektem Wege. Der Blutdruck wird unmittelbar durch eine Engstellung der Widerstandsgefäße durch Angiotensin II gesteigert, außerdem führt die Erhöhung des Extrazellulärvolumens durch Natrium- und Wasserretention durch AT II sowie konsekutiv durch Aldosteron und ADH indirekt ebenfalls zu einem Blutdruckanstieg. Der Haushalt der wichtigsten Elektrolyte  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  wird ebenfalls durch das RAAS in engen physiologischen Grenzen gehalten [1].

Die Signaltransduktion erfolgt über spezifische Rezeptoren für Angiotensin II und Aldosteron. AT II besitzt nach heutigem Kenntnisstand mindestens vier Rezeptor-Subtypen [2]. Die meisten der oben genannten Wirkungen von Angiotensin II werden durch den  $\text{AT}_1$ -Rezeptor ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) vermittelt, was pharmakologisch

durch spezifische Rezeptorblockade mittels der Stoffgruppe der Sartane genutzt wird, beispielsweise bei arterieller Hypertonie [3].

Aldosteron vermittelt seine Wirkungen über den Mineralocorticoid-Rezeptor (MCR) aus der Familie der nukleären Steroidhormon-Rezeptoren, zu denen unter anderem auch der Vitamin D-Rezeptor und der Glukokortikoid-Rezeptor gehören. Diese Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, welche nach Bindung ihres jeweiligen Liganden in Zellkern wandern. Dort binden sie an spezifische Sequenzen in der Promotorregion bestimmter Gene und verstärken oder vermindern damit deren Expression. Dieser Mechanismus ist langwierig, sodass Effekte erst nach geraumer Zeit in Erscheinung treten [1].

Neben den „klassischen“ Aufgaben des RAAS sind in den vergangenen zwei Dekaden weitere, bislang unbekannte Wirkungen dieses Hormonsystems bekannt geworden. Die überraschende Entdeckung von Komponenten des RAAS in verschiedensten Geweben des menschlichen Organismus hat zur Hypothese eines vom systemischen Hormonsystem mehr oder weniger unabhängigen „Gewebe-RAAS“ geführt, welches als auto- und parakrines System lokale Wirkungen entfaltet [4].

So gibt es zunehmend Evidenz dafür, dass lokale RAA-Systeme eine bedeutende Rolle bei der Regulation physiologischer Vorgänge auf Zellebene, wie etwa Zellwachstum, Proliferation und Apoptose spielen. „Gewebe-RAAS“ sind mittlerweile für zahlreiche Organsysteme des Menschen beschrieben worden, so zum Beispiel in Herz, Gefäßsystem, Gastrointestinaltrakt und Niere. Aber auch in Organen wie ZNS, Fettgewebe oder Zellen des Immunsystems scheinen lokale RAAS-Effekte essentiell zu sein. Jedoch ist oftmals strittig, in wie weit zirkulierende, systemische RAAS-Komponenten einen wesentlichen Einfluss auf diese Gewebeprozesse haben [4].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt auch eine herausragende Rolle bei der Pathophysiologie zahlreicher, klinisch hochrelevanter Erkrankungen. So

gehören Pharmaka zur Dämpfung des RAAS zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten weltweit, zum Beispiel ACE-Inhibitoren oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten. Zu den Anwendungsbereichen zählen unter anderem Nieren- und Hochdruckerkrankungen, Herzinsuffizienz und Atherosklerose, allesamt „Volkskrankheiten“ mit immenser gesellschaftlicher Bedeutung [3].

Auf Gewebeebene spielen parakrine RAAS bei chronisch-entzündlichen und proliferativen Prozessen eine wichtige Rolle, deren Ausmaß erst zunehmend verstanden wird. Durch Interaktionen mit wichtigen proinflammatorischen und proliferativen Zytokinen und Transkriptionsfaktoren, wie etwa dem TNF- $\alpha$  („Tumor-Nekrose-Faktor alpha“), dem TGF- $\beta$ 1 („Transforming-Growth-Factor  $\beta$ 1“) oder dem NF $\kappa$ B („Nuclear Factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-Cells“), nehmen lokale RAAS Einfluss auf immunologische und fibrotische „remodeling“-Prozesse verschiedener Organe [5, 6, 7].

Bedeutsam war in diesem Zusammenhang auch die Entdeckung bislang unbekannter Angiotensin-Moleküle ab den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts, welche auf neu aufgedeckten Wegen aus den altbekannten AT I und AT II entstehen. Diese „neuen“ Angiotensine scheinen dabei teilweise als physiologisches Gegengewicht in Balance mit den primären Wirkungen des RAAS zu stehen. Eine zunehmende Zahl dieser Effektormoleküle wurde seitdem identifiziert, deren physiologische und pathophysiologische Rolle bei unterschiedlichen Krankheitsprozessen jedoch zum Großteil noch unklar ist [8].

In den Fokus der Aufmerksamkeit rückte in den letzten Jahren vor allem der enzymatische Signalweg eines neuentdeckten ACE-Homologes, der sogenannten Angiotensin Converting Enzyme-related Carboxypeptidase (ACE 2), deren Erstbeschreibung Donoghue et al im Jahre 2000 gelang [9]. Dieses Enzym spaltet AT II durch Hydrolyse der einzelnen, c-terminalen Aminosäure zu einem Heptapeptid, dem Angiotensin 1-7 (Ang 1-7). Alternativ metabolisiert es mit geringerer Affinität AT I, ebenfalls durch c-terminale Abspaltung einer Aminosäure, zu Ang 1-9, welches dann durch das herkömmliche ACE zu Ang 1-7 weiter verkürzt werden kann.

ACE 2 scheint auf diese Weise die herkömmliche Enzymkaskade des RAAS zu antagonisieren, woraus letztendlich erniedrigte AT II-Konzentrationen resultieren. Dies geschieht nach heutiger Ansicht durch direkten Abbau von AT II zu Ang 1-7, sowie durch Reduktion der Verfügbarkeit von AT I als Hauptsubstrat des primären RAAS-Signalwegs. Interessanterweise wird ACE 2 dabei nicht durch die therapeutischen Substanzen der ACE-Inhibitoren beeinflusst [9].

Neben diesen beiden Hauptachsen des RAAS über ACE und ACE 2 existieren möglicherweise weitere, gewebespezifische Reaktionskaskaden, welche zur Produktion von AT II und weiteren Angiotensinen beitragen könnten. Zu den potentiellen Enzymen dieser alternativen Signalwege zählen unter anderem das „Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme“ (CAGE), Chymase, t-PA und Cathepsin G. Diese Erkenntnisse stammen zumeist aus *in vitro*-Studien, sodass die physiologische Bedeutung dieser Enzyme fraglich bleibt [10].

Abbildung 2 zeigt das „erweiterte RAAS“ in der Übersicht:

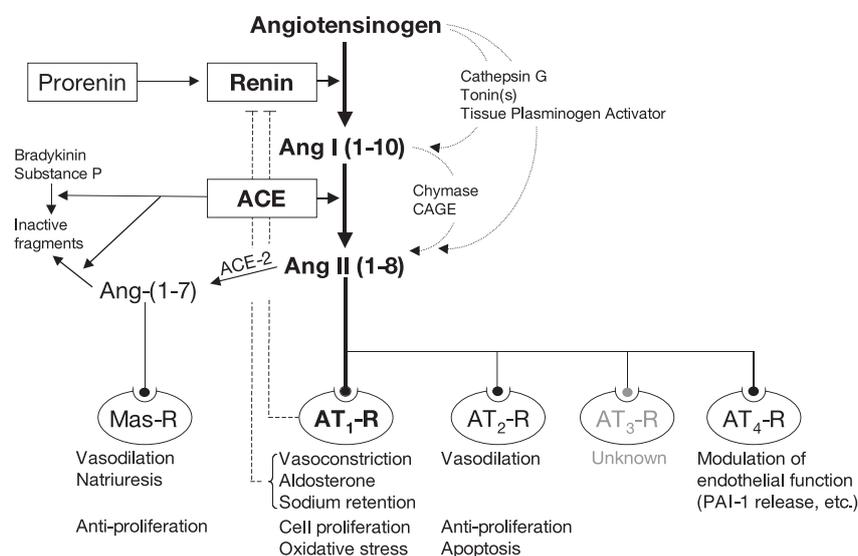


Abb. 2: Das erweiterte RAAS. Modifiziert nach Steven A. Atlas, 2007

Obwohl die biologische Bedeutung dieser „neuen“ Angiotensine bislang nur unvollständig aufgeklärt ist, scheint zumindest Ang 1-7 eine spezifische, die blutdrucksteigernden und proliferativen Wirkungen des AT II antagonisierende Rolle

einzunehmen [11, 12, 13]. Seine Wirkungen werden hierbei durch den sogenannten Mas-Rezeptor vermittelt, einem bislang wenig beachteten, G-Protein-gekoppelten Proto-Onkogen [14].

### 1.2 Vitamin D: Wirkungen und Interaktionen

Vitamin D ist ein prominentes Mitglied der Familie der steroidalen Hormone. Ursprünglich wurde als Aufgabe dieses Hormones lange Zeit lediglich die Regulation des Calcium- und Phosphathaushaltes sowie des Knochenmetabolismus angesehen. Sein aktiver Metabolit,  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$ , fördert die Calcium- und Phosphatresorption im Dünndarm und steigert die Reabsorption der beiden Elektrolyte in den Nierentubuli. Die Calcium-Reabsorption wird hierbei teilweise indirekt über eine erhöhte Freisetzung von Parathormon (PTH) in der Nebenschilddrüse bei reduziertem Serum-Calcium-Spiegel vermittelt. Im Skelett ist das Hormon essentiell zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Mineralisierung der Knochenmatrix, ebenfalls in komplexem Zusammenspiel mit PTH und Calcium [15].

Mittlerweile ist weithin bekannt, dass  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  neben diesen systemischen Hormonwirkungen weitere, vom Calcium-Phosphat-Haushalt unabhängige Wirkungen im Sinne eines parakrinen Gewebehormons besitzt. So unterdrückt  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  das Zellwachstum, reguliert Apoptose und besitzt immunmodulatorische Eigenschaften [16, 17, 18].

Eine weitere interessante Wirkung von  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  ist die Interaktion mit dem oben vorgestellten Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin  $\text{D}_3$  wirkt dabei als negativer endokriner Regulator auf die Renin-Synthese und reduziert damit die Aktivität des RAAS, und zwar unabhängig von Calcium- und PTH-Spiegeln [19]. Der „cross-talk“ dieser beiden Hormonsysteme wird unter anderem für die positive Wirkung einer Vitamin D-Substitution auf den Blutdruck verantwortlich gemacht, was aktuell auch in therapeutischer Hinsicht Gegenstand intensiver Forschung ist [20].

Zur Verdeutlichung der Interaktion von  $1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin D}_3$  und RAAS dient Abbildung 3:

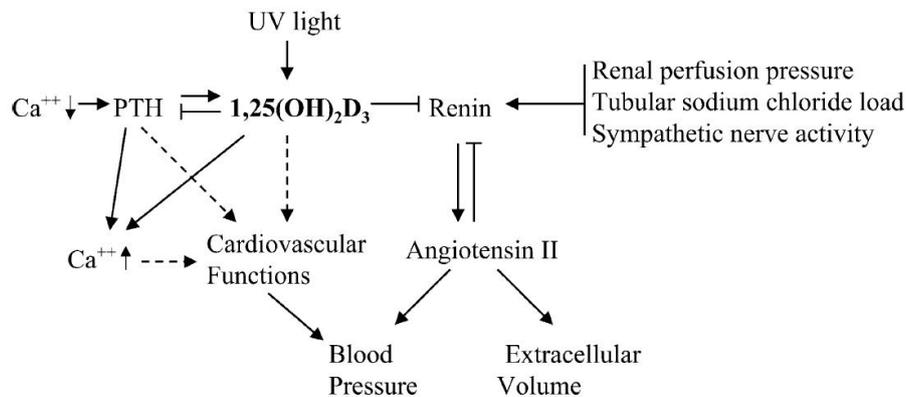


Abb. 3: Interaktion von Vitamin D und RAAS. Nach Y.C. Li et al, 2004

$1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin D}_3$  hemmt die Renin-Expression und reguliert die PTH-Sekretion. Damit hat es direkt und indirekt über Plasma-Calciumkonzentrationen Einfluss auf kardiovaskuläre Funktionen und die langfristige Blutdruckregulation. Vermittelt wird der Signalweg von  $1,25(\text{OH})_2\text{-Vitamin D}_3$  dabei durch den Vitamin D-Rezeptor (VDR), welcher, wie der oben bereits beschriebene Mineralocorticoid-Rezeptor, aus der Familie der nukleären Steroidhormon-Rezeptoren stammt.

Neben den Wirkungen des VDR auf Transkriptionsebene sind auch schnelle Hormonwirkungen bekannt, welche nach wenigen Minuten bis Stunden auftreten und nicht mit den weiter oben dargestellten Mechanismen der Genexpression erklärbar sind [21]. Neuere Hypothesen gehen davon aus, dass neben dem klassischen, nukleären VDR ein membranständiger, in Caveolen konzentrierter VDR existiert, welcher hauptverantwortlich für die Vermittlung dieser „rapid responses“ ist [22].

Ursprünglich nach seiner Entdeckung als klassisches Vitamin deklariert, ist der adulte menschliche Organismus sehr wohl in der Lage, Vitamin D unter Voraussetzungen in suffizienter Quantität selbst zu synthetisieren. Ausgangsmolekül für die *de novo*-Synthese ist hierbei das ebenfalls endogen hergestellte Cholesterol-Derivat

7-Dehydrocholesterol. Durch Ringspaltung am B-Ring des 7-Dehydrocholesterols unter UVB-Lichtexposition im stratum basale der Epidermis und nachfolgender Isomerisation entsteht das Secosteroid Cholecalciferol (= „Vitamin D<sub>3</sub>“) [23]. In der Leber wird Vitamin D<sub>3</sub> enzymatisch am C25-Atom zu 25(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> hydroxyliert, welches die hauptsächliche im Blut zirkulierende und somit als klinischer Parameter messbare Form des Vitamin D darstellt. Der Transport des lipophilen Moleküls erfolgt dabei hauptsächlich über das Vitamin D-bindende Protein (DBP), sowie in weitaus geringerem Maße an Albumin gebunden. Schließlich wird das 25(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> in der Niere durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase am C1-Atom zum biologisch aktiven Metabolit 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> = Calcitriol) hydroxyliert. Eine exogene Zufuhr pflanzlicher oder tierischer Vitamin D-Vorstufen, im wesentlichen Ergocalciferol (= „Vitamin D<sub>2</sub>“) respektive Cholecalciferol (= „Vitamin D<sub>3</sub>“), ist zumindest theoretisch nicht essentiell [24].

Dennoch herrscht in den westlichen Ländern eine hohe Prävalenz von Vitamin D-Mangel. So stellten Tangpricha et al fest, dass bis zu 30% der untersuchten Probanden, junge, gesunde Erwachsene in den USA, an Vitamin D-Mangel litten. Auffällig war hierbei vor allem eine signifikante Zunahme der Prävalenz in den Wintermonaten [25]. Zurückgeführt wird dies auf geringe UV-Lichtexposition, vor allem im Winter, sowie auf Ernährungsgründe. Die 2008 erschienene Nationale Verzehrsstudie II des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz kam zu dem Ergebniss, dass insgesamt 82% der Männer und 91% der Frauen in Deutschland die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlene Zufuhr von 5  $\mu$ g pro Tag nicht erreichten (siehe Abb. 4 auf Seite 10) [26].

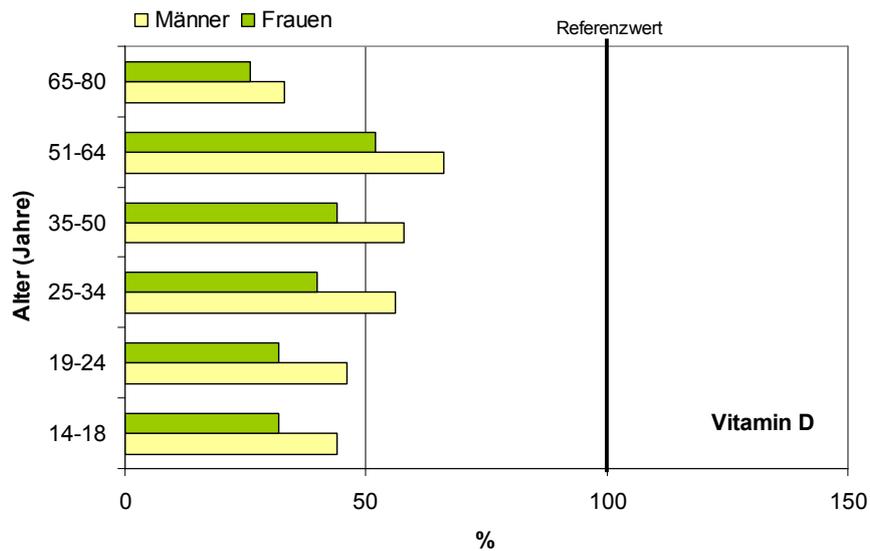


Abb. 4: Mediane Vitamin D-Zufuhr in % der empfohlenen Tageszufuhr.

Aus: Nationale Verzehrsstudie II, 2008

In den USA und anderen Ländern werden sogar noch höhere Tagesdosen von 10-15  $\mu\text{g}$  pro Tag empfohlen, bei Personen ab 70 Jahren gar 20  $\mu\text{g}$  [27]. Durch chronischen Vitamin D-Mangel hervorgerufene Erkrankungen umfassen den sekundären Hyperparathyreoidismus, Osteoporose, Osteomalazie sowie die Rachitis bei Kindern, einem Krankheitsbild mit weltweit steigender Inzidenz und hoher sozioökonomischer Bedeutung [28]. Die überraschend hohe Prävalenz von Vitamin D-Mangel ist jedoch auch deshalb von Bedeutung, da aufgrund epidemiologischer und ernährungswissenschaftlicher Daten eine Assoziation von subklinischem Vitamin D-Mangel mit arterieller Hypertonie, Diabetes Mellitus sowie verschiedenen Autoimmunkrankheiten und Malignomen als gesichert gilt [29].

Die chronische Niereninsuffizienz ist eine der wichtigsten ätiologischen Ursachen für einen Vitamin D-Mangel. Aus dem Untergang von Parenchym und dem fibrotischen Umbau in den Nieren resultiert ein Verlust sowohl der exokrinen als auch der endokrinen Funktion [30]. Verschiedene Studien zeigten auch eine hohe Prävalenz von Vitamin D-Mangel bei Patienten, die ein Nierenersatzverfahren mit-

tels Peritonealdialyse erhielten, zum Teil waren über 90% der Patienten betroffen [31, 32].

Klassische Symptome des Vitamin D-Mangels sind Knochenschmerzen und Muskelschwäche, also Zeichen der Hypokälziämie [30]. Mittelfristig reagiert der Körper auf chronisch erniedrigte Kalzium-Spiegel mit einer erhöhten Ausschüttung von Parathormon aus der Nebenschilddrüse, es kommt zum sogenannten sekundären Hyperparathyreoidismus. Die Folgen davon sind oftmals Osteoporose, Urolithiasis und Verkalkungen der Gefäße. Therapeutisch wird  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Calcium substituiert, um den Hormon- und Mineralhaushalt wieder in Homöostase zu bringen [30].

### 1.3 Chronische Niereninsuffizienz und Peritonealdialyse (PD)

Die chronische Niereninsuffizienz ist die gemeinsame Endstrecke verschiedener Erkrankungen und ist gekennzeichnet durch den Verlust der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion der Nieren. Die Inzidenz der chronischen Niereninsuffizienz wird mit 10-60/100.000 pro Jahr angegeben, dies entspricht für Deutschland 8-48.000 Neuerkrankungen jährlich [30].

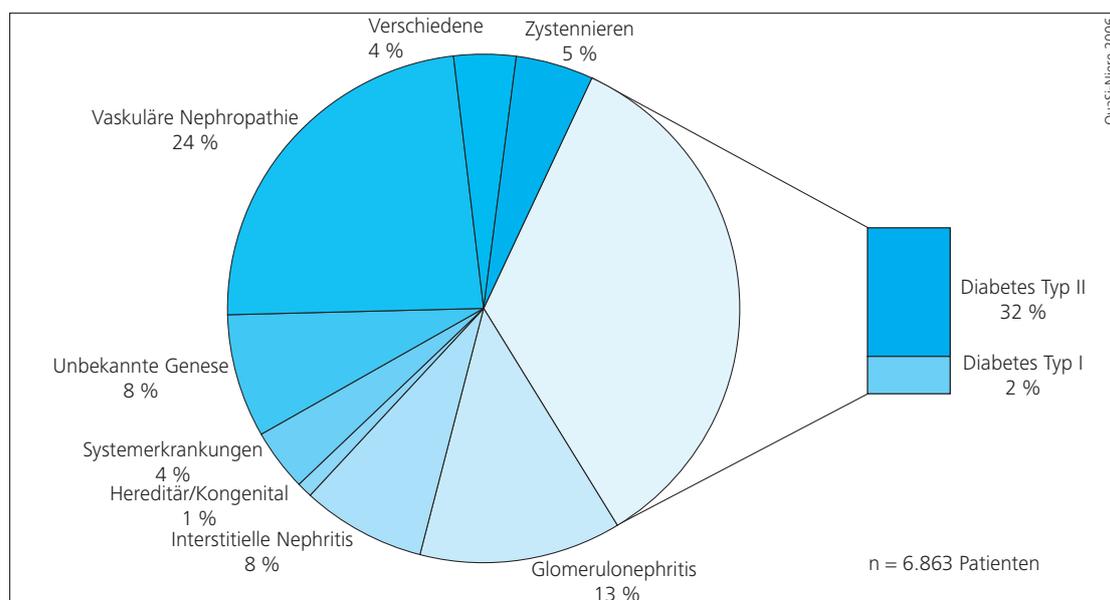


Abb. 5: Ätiologie der chron. Niereninsuffizienz in Deutschland, Stand: 2006.

Nach Frei und Schober-Halstenberg, 2008

Laut der letzten Erhebung der „QualitätsSicherung Nierenersatztherapie (QuaSi-Niere) gGmbH“, einer gemeinnützigen Gesellschaft unter Initiative des Bundesministeriums für Gesundheit, war die häufigste Ursache der chronischen Niereninsuffizienz im Jahr 2006 in Deutschland die diabetische Nephropathie, gefolgt von der vaskulären (hypertensiven) Nephropathie und den Glomerulonephritiden (siehe Abb. 5 auf Seite 11) [33].

Klinisch zeigt sich bei der chronischen Niereninsuffizienz zu Beginn häufig Polyurie mit Isothenurie, Hypertonie und Lidödeme, im weiteren Verlauf dann eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes und des Ernährungszustandes, Oligurie mit Überwässerung und Symptome der Urämie durch Akkumulation harnpflichtiger Substanzen [30].

Laborchemisch findet sich ein Anstieg der Retentionswerte Kreatinin und Harnstoff, eine Hyperkaliämie, eine renale Anämie, metabolische Entgleisungen sowie Proteinurie und Hypoalbuminämie [30].

Die chronische Niereninsuffizienz wird gemäß der National Kidney Foundation (NKF) in den USA anhand der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) in fünf Stadien eingeteilt:

Stadium	Bezeichnung	GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )
0	Erhöhtes Risiko für Niereninsuffizienz	≥ 90
1	Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion	≥ 90
2	Nierenschädigung mit milder Niereninsuffizienz	60-89
3	Mittelschwere Niereninsuffizienz	30-59
4	Schwere Niereninsuffizienz	15-29
5	Nierenversagen	< 15

Abb. 6: Stadien der chron. Niereninsuffizienz nach der NKF

Therapeutisch steht die Behandlung der Grunderkrankung an erster Stelle, um die Progression der Niereninsuffizienz zu verhindern. Weitere Maßnahmen sind das Vermeiden nephrotoxischer Substanzen wie nichtsteroidale Analgetika, bestimmte Antibiotika und Röntgenkontrastmittel. Eine Erhöhung der Flüssigkeitszufuhr auf 2,0-2,5 l pro Tag bei strenger Flüssigkeitsbilanzierung wird empfohlen [30].

Die medikamentöse Blutdruckeinstellung auf Zielbereiche unter 130/80 mmHg gilt als wichtigste Maßnahme zur Vermeidung der Krankheitsprogression. Als prognostisch günstigste Medikamentengruppe haben sich hierbei Präparate zur Blockade des RAAS erwiesen, namentlich in Form von ACE-Inhibitoren und AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten [30].

Im Terminalstadium der Erkrankung ist ein Nierenersatzverfahren unumgänglich. In der Regel ist dies der Fall, wenn die GFR unter 15 ml/min/1,73m<sup>2</sup> fällt (Stadium 5) und wenn lebensbedrohliche Urämiesymptome auftreten wie Lungenödem, Perikarditis oder metabolische Azidose [30].

Die Hämodialyse ist die verbreitetste Form der Dialyse weltweit. In Deutschland wird sie bei etwa 95% der Dialysepatienten angewendet [33]. Bei diesem Verfahren wird, über chirurgisch angelegte Dialyseshunt, das Blut des Patienten in eine Dialysemaschine gepumpt. Dort werden im Gegenstromprinzip harnpflichtige Substanzen und Wasser aus dem Blut über eine semipermeable Membran in ein Dialysat überführt und somit aus dem Körper eliminiert. Üblicherweise wird dies dreimal pro Woche durchgeführt, wobei eine „Sitzung“ in etwa vier bis fünf Stunden in Anspruch nimmt. Grundsätzlich ist bei terminaler Niereninsuffizienz eine Nierentransplantation anzustreben, was jedoch durch einen Mangel an Spenderorganen lange Wartezeiten für die Patienten mit sich bringt [30].

Die Peritonealdialyse ist ein weiteres, etabliertes und der Hämodialyse gleichwertiges Verfahren zur Nierenersatztherapie. Bei diesem Verfahren erfolgt der Stoffaustausch entlang der peritonealen Membran. Diese Membran bildet die Schnittstelle zwischen Dialysat und Blut und setzt sich aus zwei Anteilen zu-

sammen: zum Einen dem parietalen Peritoneum, welches die innere Bauchdecke auskleidet und circa 10% der Kontaktfläche ausmacht, sowie dem viszeralem Peritoneum, das die intraperitoneal gelegenen Organe bedeckt und die übrigen 90% der Kontaktfläche darstellt. Die peritoneale Membran besteht unter Normalbedingungen aus einem einreihigen, kubischen Epithel, dem Mesothel, sowie darunter liegendem, lockerem Bindegewebe mit zahlreichen Blutgefäßen. Die Gesamtoberfläche des Peritoneums beträgt circa 1-2 m<sup>2</sup> und entspricht bei Erwachsenen in etwa der Körperoberfläche [34].

Diese auch als Bauchfell bezeichnete seröse Haut bildet und resorbiert physiologischerweise die Peritonealflüssigkeit, normalerweise circa 50-100 ml, und ermöglicht dadurch als Gleitschicht die Verschieblichkeit der abdominalen Organe. Desweiteren kommt dem Peritoneum in Form des Omentum majus eine immunologische Funktion bei der Eindämmung und Bekämpfung von Infektion im Bauchraum zu. Das Omentum majus („großes Netz“) ist eine Peritonealfalte, welche an der großen Magenkurvature aufgehängt ist und große Teile der Darmschlingen von oben her bedeckt. Im Falle lokaler Entzündungen, etwa nach Trauma oder Perforation, kann sich das Omentum dem Infektfocus anlegen und somit lokal eindämmen, um eine generalisierte Peritonitis zu verhindern. Zu diesem Zweck ist das große Netz mit zahlreichen Zellen des Immunsystems durchsetzt, vor allem Makrophagen und Lymphozyten [34].

### 1.3.1 Geschichte

Die Idee, das Peritoneum als eine mögliche Dialysemembran zu verwenden, wurde bereits 1923 von T. J. Putnam in Baltimore, USA publiziert. Er war der Erste, der den Stoffaustausch vom Blut über die Peritonealmembran in die Bauchraumflüssigkeit untersuchte. Vorangegangen waren einige Untersuchungen darüber, dass ein Stoffaustausch in umgekehrter Richtung möglich ist, nämlich von in die Bauchhöhle eingebrachte Lösungen in das Blut, zum Beispiel in Arbeiten von Georg Wegner in Berlin und Cunningham in England [35, 36].

Putnam untersuchte erstmals, überwiegend an lebenden Katzen, ob sich gelös-

te Blutbestandteile über das Peritoneum eliminieren lassen. Es stellte sich heraus, dass dies, entlang eines Konzentrationsgefälles, zuverlässig durchführbar war. Er stellte außerdem fest, dass neben dem rein physikalischen Diffusionsprozess ein weiterer Mechanismus des Stoffaustausches existieren müsse, denn die beobachteten Stoffaustauschraten variierten zum Teil erheblich von der erwarteten, rein diffusionsgetriebenen Angleichung der Stoffkonzentrationen der beiden Flüssigkeiten. Er vermutete aktive Phagozytose und erleichterte beziehungsweise erschwerte Diffusion durch die Ultrastruktur des membranösen Filters [37].

Der erste peritoneale Stoffaustausch am Menschen wird heute dem Würzburger Internisten Georg Ganter zugeschrieben, welcher 1923 seine wegweisende Arbeit „Über die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blute durch Dialyse“ veröffentlichte [38]. Er therapierte einen aufgrund einer Glomerulonephritis akut urämische Patienten durch Instillation von 750 ml Natriumchlorid-Lösung in das peritoneale Cavium. Trotz anfänglicher Besserung starb der Patient wenige Tage nach Entlassung, vermutlich durch die erneute Akkumulation harnpflichtiger Substanzen. Ganter erkannte zwar das Potential der Peritonealdialyse, verließ dieses Forschungsgebiet jedoch, welches daraufhin lange Zeit nur geringe Fortschritte verzeichnen konnte [34].

In den 60er-Jahre des letzten Jahrhunderts wurden dann erstmals Peritonealdialysen bei chronischer Niereninsuffizienz eingesetzt. Diese wurden meist wöchentlich ambulant in spezialisierten Zentren durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Katheter und Dialysemaschinen entwickelt, welche jedoch allesamt große Probleme hinsichtlich Infektionen und technischem Versagen zeigten [39]. Fred Boen von der University of Washington in Seattle war seinerzeit Vorreiter für die Entwicklung peritonealer Dialyseverfahren. Er gelangte zu der Überzeugung, dass dauerhaft implantierte Kathetersysteme ein zu großes Risiko für Adhäsionen und Infektionen im Bauchraum darstellten. Er ging daraufhin dazu über, Peritonealdialysen durch wiederholte Punktionen der Bauchhöhle mit Einmalkathetern durchzuführen [40].

Diese Methode, mit ihrer ständigen Notwendigkeit zeitaufwändiger Punk-

tionen, stellte sich mit zunehmenden Patientenzahlen als unpraktikabel heraus, zumal sich auch die Dialyse-Intervalle von einmal wöchentlich als unzureichend erwiesen. Der deutsche Arzt Henry Tenckhoff, der ebenfalls an der University of Washington in Seattle tätig war, begann deshalb mit der Weiterentwicklung von Kathetersystemen. Er verwendete Silikon-Katheter sowie, als wichtigste Neuerung, zwei sogenannte Dacron-Manschetten. Dacron ist ein biokompatibles, synthetisches Polyester. Auf die Implantation der Manschetten, je eine davon intraperitoneal und eine subkutan, antwortet der Körper mit einer starken fibrotischen Reaktion, wodurch das Material fest in das umgebene Gewebe einwächst und eine Barriere für Infektionserreger darstellt. Tenckhoff erzielte mit diesem Verfahren einen bahnbrechenden Erfolg in der Reduktion der Peritonitiden als Komplikation der Peritonealdialyse [41].

Der größte limitierende Faktor, um die Peritonealdialyse zu Hause durchführen zu können, war damals die unzureichende Möglichkeit, sterile und pyrogenfreie PD-Lösungen herzustellen. Es war ebenfalls Henry Tenckhoff, der hierfür im Jahre 1970 den technischen Durchbruch schaffte und ein Dialysesystem vorstellte, welches erstmals eine häusliche, durch den Patienten erlernbare, intermittierende Peritonealdialyse ermöglichte [42].

Bis Mitte der 70er-Jahre wurde die intermittierende Peritonealdialyse weiter verbessert und galt als sinnvolle Alternative zum Standardverfahren der Hämodialyse, wenn diese nicht zur Verfügung stand oder der Patient nicht geeignet für dieses Verfahren war. 1975 entwickelten Popovitch und Moncrief in Austin, USA einen neuartigen Ansatz, bei dem geringere Mengen an Dialysat über einen längeren Zeitraum in der Bauchhöhle belassen wurden [43]. Dieses Verfahren ermöglichte eine kontinuierliche Auswaschung der harnpflichtigen Substanzen über den ganzen Tag und sieben Tage in der Woche, was der physiologischen Arbeitsweise der Nieren deutlich näher kam als alle bisherigen Verfahren. Die Patienten konnten die Beutelwechsel, welche 4-5 mal täglich notwendig wurden, nach Anleitung selbst durchführen, es waren keine Dialysemaschinen mehr notwendig. Die CAPD war geboren, die „continuous ambulatory peritoneal dialysis“ [44].

### 1.3.2 Technik und Verbreitung

Die CAPD ist heute ein anerkanntes und etabliertes Verfahren zur Nierenersatztherapie, das Prinzip hat sich dabei bis heute nicht wesentlich von dem von Popovich und Moncrief erdachten Konzept verändert. Noch immer gilt der Tenckhoff-Katheter, mitunter in verschiedenen Modifikationen, als Standard für den Zugang zum peritonealen Cavium. Das Dialysat verbleibt durchschnittlich 4-6 Stunden in der Bauchhöhle, bis dieses vom angelernten Patienten selbst und ohne maschinelle Hilfe ausgewechselt wird. Die ärztliche Kontrolle erfolgt meist in ambulanten Sprechstunden in monatlichen Intervallen [34].

Neben dem CAPD-Verfahren existieren weitere PD-Modalitäten, die mithilfe maschineller Unterstützung operieren. Diese „automatisierte PD“ (APD) funktioniert unter Verwendung eines sogenannten Cyclers, welcher die Beutelwechsel automatisch nach gewissen Vorgaben durchführt. Hier existieren wiederum verschiedene Varianten des Verfahrens, die wichtigsten sind die „cyclische, kontinuierliche PD“ (CCPD) und die „nächtliche intermittierende PD“ (NIPD). Bei Ersterer werden nachts in kurzen Intervallen mehrere Beutelwechsel durch den Cycler durchgeführt. Tagsüber wird, analog zur CAPD, das Dialysat länger im Cavium belassen. Bei der NIPD entfällt diese kontinuierliche Komponente bei Tag, es wird ausschließlich nachts per Cycler dialysiert [34].

Die Entscheidung zwischen CAPD und APD ist vor allem abhängig vom jeweiligen Patienten. APD-Verfahren eignen sich demnach vor allem für Kinder und Heranwachsende, die tagsüber die kosmetisch störenden abdominalen Flüssigkeitsansammlungen und die stigmatisierenden Beutelwechsel fürchten. Geriatrische Patienten mit hohem Pflegebedarf profitieren ebenfalls von der automatisierten PD. Auch ist das Verfahren bei geringer Nierenrestfunktion und „high transporter“-Eigenschaften (s.u.) vorteilhaft [34].

Die Dialyse-Flüssigkeiten selbst haben sich in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt. Um die Biokompatibilität zu erhöhen und damit Langzeitfolgen der Peritonealdialyse zu reduzieren, wurde die Zusammensetzung der PD-Lösungen verändert (s.u.). Prinzipiell muss die PD-Lösung sowohl einen Stoff- als auch einen

Wasseraustausch über die Peritonealmembran ermöglichen [34].

Der Stoffaustausch bei der Peritonealdialyse geschieht durch folgende Triebkräfte:

- **Diffusion** sorgt für eine passive Angleichung der Stoffkonzentrationen in Blut und Dialysat entlang eines Konzentrationsgefälles.
- **Ultrafiltration** führt zum Übertritt von Wasser über osmotische und hydrostatische Druckgradienten vom intravasalen in den intraperitonealem Raum.
- **Konvektion** ist die Mitnahme von im Plasmawasser gelösten Stoffen bei der Ultrafiltration. Sie ist abhängig von Größe und elektrischer Ladung der Stoffe.

Diffusion ist ein passiver, energieneutraler Prozess. Sie basiert auf der sogenannten Brown'schen Molekularbewegung und folgt den Gesetzmäßigkeiten des Fick'schen Diffusionsgesetzes. Dieses besagt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit umso größer ist, je größer die Kontaktfläche und je dünner die Dicke der Membran ist. Außerdem steigert ein großes Konzentrationsgefälle den Diffusionsstrom, auch von der Art der diffundierenden Teilchen und von der Temperatur wird die Geschwindigkeit der Diffusion beeinflusst [34].

Die Ultrafiltration ist abhängig von der Osmolarität der beteiligten Flüssigkeiten sowie vom hydrostatischen Druck. Letzterer ist im Falle der Peritonealdialyse vom Blutdruck in den Kapillaren des Peritoneums bestimmt und sorgt für ein „Abpressen“ von Plasmawasser ins Cavitum. Da dies für einen adäquaten Wasserentzug bei der Peritonealdialyse nicht ausreichend ist, wird durch Zugabe von Osmolyten in die PD-Flüssigkeit ein osmotischer Druckgradient erzeugt, welcher zusätzlich Wasser aus dem Blut in die Bauchhöhle „zieht“ [34].

Traditionellerweise wird als Osmolyt hierzu Glucose in hoher Konzentration verwendet. Aus verschiedenen Gründen, welche weiter unten ausgeführt werden, hat sich die Verwendung von Glucose jedoch als nicht zufriedenstellend erwie-

sen, so dass in den letzten Jahren „biokompatiblere“ PD-Lösungen mit anderen Osmolyten entwickelt wurden [34].

Die Resultate, die heutzutage mit der Peritonealdialyse erzielt werden, sind durchaus mit denen der Hämodialyse zu vergleichen. Zahlreiche randomisierte klinische Studien haben das Mortalitäts-Outcome der beiden Verfahren verglichen, die Ergebnisse sind zum Teil jedoch widersprüchlich. Langjährige Beobachtungszeiträume, ein multimorbides Patientengut sowie unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien erschweren die Vergleichbarkeit dieser Studien. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch mehrheitlich, dass beide Verfahren hinsichtlich des langfristigen Outcomes ebenbürtig sind und dass die Peritonealdialyse in den ersten Jahren nach Beginn des Nierenersatzverfahrens der Hämodialyse sogar überlegen ist [45, 46, 47].

Obwohl manche Autoren die Peritonealdialyse gar als First-Line-Therapie vorschlagen, spielt die Peritonealdialyse weltweit in den meisten Ländern nur eine untergeordnete Rolle bei der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz [48]. Laut dem QuaSi-Niere Jahresbericht 2008 erhielten in Deutschland zum Stichtag des 31.12.2006 insgesamt 66.508 Patienten eine chronische Nierenersatztherapie (s. Abb. 7 auf Seite 20), dies entspricht einer Prävalenz von 808 Dialysepatienten pro Million Einwohner. Die Inzidenz betrug 213 pro Million Einwohner, das heißt innerhalb eines Jahres wurden 17.548 Patienten neu in die chronische Dialyse aufgenommen, was einer Steigerung von 4,6% im Vergleich zum Vorjahr darstellte [33].

Aus dem Bericht geht ebenfalls hervor, dass die Peritonealdialyse in Deutschland trotz weitgehend gleichwertiger Ergebnisse im Vergleich zur Hämodialyse nur eine relativ geringe Rolle bei der Therapie der chronischen Niereninsuffizienz spielt. Der Anteil der Peritonealdialyse betrug zum Stichtag lediglich 4,8%, die CAPD ist davon die am häufigsten verwendete Modalität. Bundesweit waren zum Stichtag 400 Einrichtungen mit PD-Angebot gemeldet, eine flächendeckende Betreuung für diese Verfahren wäre somit gewährleistet. Die Gründe für die Ver-

nachlässigung der Peritonealdialyse bei der chronischen Niereninsuffizienz sind unbekannt [33].

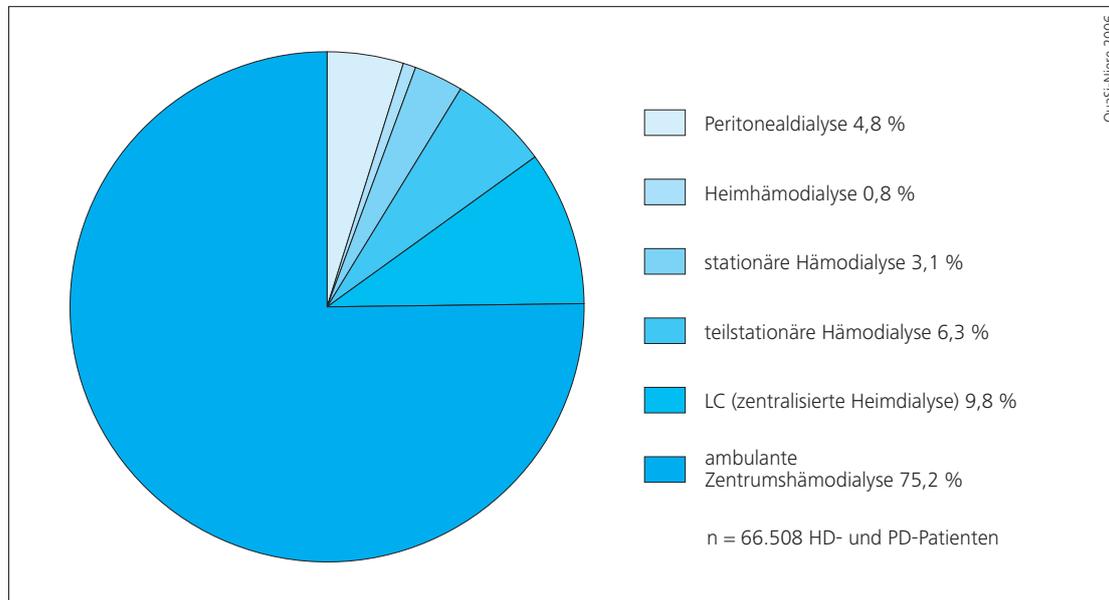


Abb. 7: Verteilung der Patienten nach Dialyseversorgungsarten in Deutschland, Stand: 2006.

Nach Frei und Schober-Halstenberg, 2008

Im internationalen Vergleich zeigt sich ein sehr durchwachsenes Bild bei der Prävalenz der Peritonealdialyse. Laut aktueller Erhebungen werden derzeit circa 197.000 Patienten weltweit durch Peritonealdialyse therapiert, was einem Anteil von 11% aller Dialysepatienten entspricht [49]. Im Ländervergleich zeigen sich jedoch erhebliche Differenzen.

Beispielhaft seien hier einige Länder aufgezählt [49, 50]:

- Länder mit hoher PD-Prävalenz: Mexico (65,8% Anteil), Neuseeland (36,3%), Südafrika (32,0%)
- Länder mit mittlerer PD-Prävalenz: Niederlande (20,1%), Großbritannien (17,0%), China (14,0%)
- Länder mit geringer PD-Prävalenz: Frankreich (7,5%), USA (7,2%), Japan (3,3%)

Insgesamt scheint sich dabei eine Tendenz zum Rückgang der Peritonealdialyse in den westlichen Industriestaaten abzuzeichnen, während in den Entwicklungsländern ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen ist [49].

Als Gründe für die steigende Bedeutung der Peritonealdialyse in den Entwicklungsländern werden vor allem die Einfachheit des Verfahrens mit geringem technischen Aufwand, sowie geringe Anforderungen an das medizinische Fachpersonal genannt [51, 52].

Für den Rückgang der Peritonealdialyse in den Industriestaaten werden vor allem strukturelle Gründe vermutet, beispielsweise Verfügbarkeit und Vergütung, sowie größere Erfahrung und bessere Ausbildung in der Hämodialyse [53, 54]. Zu der niedrigen Prävalenz der Peritonealdialyse trägt ebenfalls die hohe Transferrate von PD-Patienten zur Hämodialyse bei. Laut dem „U.S. Renal Data System“ (USRDS) wechseln bis zu 9,5% der PD-Patienten jährlich in die Hämodialyse. Als Gründe werden rezidivierende Peritonitiden, Ultrafiltrationsverlust sowie soziale und persönliche Gründe vermutet [50].

### 1.3.3 Komplikationen und Langzeitfolgen

Rezidivierende infektiöse Peritonitiden galten lange Zeit als „Achillesverse“ der PD und führten häufig zu Therapieversagen. Durch gezielte Patientenschulung und technische Neuerungen wie dem „twin bag“-System konnte die Peritonitisrate drastisch gesenkt werden. Dennoch zählen Infektionen weiterhin zu den häufigsten Komplikationen der PD, grampositive Bakterien der Hautflora wie Staphylokokken stellen hierbei die häufigsten Erreger dar. Weitere wichtige unerwünschte Folgen der PD sind Hernien, metabolische Entgleisungen sowie kardiovaskuläre und gastrointestinale Komplikationen [34].

Eines der größten Hindernisse der langfristigen PD-Therapie stellt jedoch der sogenannte Ultrafiltrationsverlust dar [55]. Dieser Ultrafiltrationsverlust ist gekennzeichnet durch einen reduzierten Wasserentzug bei der Dialyse und resultiert klinisch in einer Überwässerung des Patienten. Es lassen sich hierbei zwei unterschiedliche Pathomechanismen unterscheiden [34]:

- UF-Versagen Typ I: im Verlauf einer langjährigen PD-Therapie entwickelt der Patient durch eine vermehrte Vaskularisation des Peritoneums einen „high transporter“-Status, das heißt der peritoneale Stoffaustausch ist gesteigert. Daraus resultiert eine schnellere Angleichung der Stoffkonzentrationen in Blut und Dialysat, jedoch auch eine gesteigerte Resorptionsrate von Glucose aus dem Dialysat ins Blut. Dadurch fällt der osmotische Druckgradient zu rasch, um eine ausreichende Ultrafiltration zu gewährleisten.
- UF-Versagen Typ II: durch Verlust von Austauschfläche, beispielsweise im Rahmen schwerer Peritonitiden mit intraabdominellen Adhäsionen, oder durch fibrotische Verdickung der Peritonealmembran, kommt es gemäß des Fick'schen Diffusionsgesetzes zu einem reduzierten Stoffaustausch und geringerer Ultrafiltration trotz hoher Glucosekonzentrationen im Auslauf.

Die genauen ursächlichen Gründe für die Hypervaskularisation und Fibrosierung des Peritoneums sind unklar. Combet et al zeigten im Jahre 2001 am Tiermodell, dass Urämie *per se* bereits Angiogenese und Fibrosierung der peritonealen Membran triggert, und zwar positiv korrelierend zum Grad der Niereninsuffizienz [56]. Klinisch zeigen sich diese Veränderungen durch die regelmäßig beobachteten urämischen Serositiden, vor allem in Form der urämischen Perikarditis.

Darüber hinaus zeigten Williams et al im darauffolgenden Jahr, dass die submesotheliale Fibrosezone im Verlauf der Peritonealdialyse signifikant an Dicke zunimmt. Außerdem stellten sie fest, dass die Fibrosierung mit der Hypervaskularisation sowie dem Grad der Vaskulopathie korreliert [57]. Auch eine gesteigerte lymphatische Resorption der gelösten Glucose wird im Verlauf der PD beobachtet [58].

Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der histologischen und funktionellen Veränderungen der peritonealen Membran wird seit geraumer Zeit den sogenannten „advanced glycosylation endproducts“ (AGE) zugeschrieben [59]. Dabei handelt es sich um glykosylierte Proteine, welche auf nicht-enzymatischem Wege in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen entstehen. Dieser Vorgang, welcher als Maillard-Reaktion bekannt ist, ist unter anderem auch für die Glycosy-

lation von Hämoglobin bei chronischer Hyperglykämie im Rahmen des Diabetes Mellitus verantwortlich. Dies wird unter anderem für die schwerwiegenden Langzeitfolgen des Diabetes Mellitus verantwortlich gemacht und kann klinisch in Form des HbA<sub>1c</sub> gemessen werden [60].

Im Rahmen der Peritonealdialyse wurden naheliegenderweise die verwendeten PD-Lösungen für die Bildung der AGE verantwortlich gemacht. Die Hitzesterilisation der glucosehaltigen Dialyseflüssigkeiten führt zur Entstehung von toxischen Reaktionsprodukten, sogenannten „glucose degradation products“ (GDP). Wie Schalkwijk et al zeigten, induzieren diese GDP neben direkten toxischen Effekten auch die Bildung von AGE [61]. Schwenger et al konnten zeigen, dass die schädliche Wirkung der AGE wiederum über einen AGE-spezifischen Rezeptor vermittelt werden, dem RAGE. Sie zeigten außerdem, dass die RAGE-Aktivierung eine dosisabhängige Expression von VEGF, NFκB und TGF-β1 induziert [62]. VEGF („vascular endothelial growth factor“) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für Neoangiogenese und wird für die Hypervaskularisation des Peritoneums bei der PD mitverantwortlich gemacht [63]. NFκB und TGF-β1 werden weiter unten genauer vorgestellt.

Neben der Neovaskularisation wird ein weiterer Pathomechanismus für die Entstehung des Ultrafiltrationsversagens diskutiert: in histologische Studien an Peritonealgewebe von PD-Patienten wird oftmals ein Verlust der mesothelialen Zellschicht beobachtet, lange Zeit ohne dass eine Erklärung dafür gefunden wurde. Yáñez-Mó et al beschrieben 2003 dieses Phänomen als eine phänotypische Transdifferenzierung der epithelialen Zellen hin zu mesenchymalen Zellen des Bindegewebes, ein Vorgang, der als „Epithel-Mesenchym-Transition“ (EMT) bezeichnet wird [64]. Hierbei verlieren die Mesothelzellen zunächst ihre interzellulären Bindungen und ihre epitheltypische, apikal-basolaterale Polarität. Zunehmend zeigen diese transitionalen Zellen eine Migration ins Interstitium, nehmen einen fibroblastenartigen Phänotyp an und zeigen fibrogenetische Aktivität. Als Ursache dieses Vorgangs wird die Schädigung des Mesothels durch PD-Lösungen mit niedrigem pH, hoher

Osmolarität und hoher Glucosekonzentration angesehen [64].

Im selben Jahr veröffentlichten Yang et al eine Studie an menschlichen Mesothelzellkulturen, welche die entscheidende Rolle des bereits erwähnten, sogenannten „Transforming-Growth-Factor  $\beta 1$ “ (TGF- $\beta 1$ ) an der EMT zeigten. Nach Inkubation der Zellkulturen mit diesem Wachstumsfaktor differenzierten sich die Mesothelzellen nach etwa 72 Stunden in Myofibroblasten, und zwar sowohl in morphologischer als auch funktioneller Sicht, denn die Zellen zeigten nun eine Synthese von Kollagen Typ I [65]. Margetts et al konnten im Mausmodell eine EMT durch vorübergehende Überexpression von TGF- $\beta 1$  induzieren [66]. Mittlerweile gilt die EMT als eine wesentliche Ursache für einen früh auftretenden „high transporter“-Status während der PD, und zwar unabhängig von der Neovaskularisation [67].

TGF- $\beta 1$  ist ein Signalmolekül aus der Gruppe der Zytokine und vor allem bei der embryonalen Entwicklung verschiedener Gewebe beteiligt. Auch in adulten Zellen spielt es eine wesentliche Rolle bei der Regulation elementarer Funktionen wie Zellwachstum und -teilung. Nahezu jede Zelle des Menschen exprimiert TGF- $\beta 1$  und besitzt Rezeptoren dafür. In zunehmenden Maße wird diesem Molekül auch eine tragende Rolle in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen zugesprochen, beispielsweise bei malignen Erkrankungen, der Atherosklerose und vor allem bei fibrotischen Prozessen in Lunge, Leber und Niere [68].

Ebenfalls gut fundiert ist der Zusammenhang zwischen TGF- $\beta 1$  und dem RAAS. Bereits 1994 zeigten Kagami et al, dass AT II die extrazelluläre Proteinsynthese in Mesangiumzellen von Rattenglomerula stimuliert und diesen Effekt über TGF- $\beta 1$  vermittelt [69]. Ruiz-Ortega und Egido bewiesen außerdem, dass AT II Zellwachstum und Matrixprotein-Synthese in Nierenfibroblasten durch TGF- $\beta 1$  stimuliert [70].

Strippoli et al zeigten im Jahre 2008, dass im Signalweg von TGF- $\beta 1$  das bereits angesprochene NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der EMT spielt [71]. NF $\kappa$ B ist ein

Transkriptionsfaktor, welcher an zahlreichen immunologischen Prozessen beteiligt ist und als einer der bedeutendsten Spieler bei der Unterhaltung von chronischen Entzündungen gilt. Es ist wesentlich beteiligt an der Pathogenese beispielsweise des Asthma bronchiale, der Colitis ulcerosa oder der Atherosklerose [72].

Zahllose Mediatoren und Signalmoleküle sind in der Lage, die NF $\kappa$ B-Expression in unterschiedlichsten Geweben zu stimulieren, darunter bekannte Proteine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-17 [73]. Unter diesen stimulierenden Substanzen befindet sich interessanterweise auch das Angiotensin II, dem bereits ausführlich beschriebenen Effektormolekül des RAAS. Hernandez-Presa et al fanden zuerst heraus, dass ACE-Inhibitoren in der Lage sind, die NF $\kappa$ B-Expression und damit die Makrophagen-Infiltration bei der Atherosklerose zu vermindern [74]. Später stellte die gleiche Arbeitsgruppe fest, dass ATII die NF $\kappa$ B-Expression in mononukleären Zellen im Rahmen eines Immunkomplex-Nephritis-Modells stimuliert [75].

Als Folge dieser Erkenntnisse zum UF-Versagen wurden neue, „biokompatiblere“ Dialyse-Lösungen (PDF = „Peritoneal Dialysis Fluids“) entwickelt. Diese neuartigen PDF verwenden anstelle von Glucose das Polysaccharid Icodextrin, welches im Peritoneum nicht metabolisiert wird und nur sehr langsam auf lymphatischem Wege resorbiert wird. Außerdem wurde Laktat als Puffer durch Bicarbonat ersetzt, um einen physiologischeren pH der Lösungen zu erzielen. Der saure, laktatgepufferte pH war zur Vermeidung der GDP-Bildung bei der Hitzesterilisation der PDF bevorzugt worden, stellte sich jedoch als schädlich für die peritoneale Membran heraus. Durch neue technische Verfahren wie dem Mehrkammerbeutel und den Ersatz von Glucose durch Icodextrin kann auf saure PDF verzichtet werden [76].

Zur anschaulichen Darstellung des Einflusses der Biokompatibilität der PDF dient Abbildung 8 auf Seite 26 [77]:

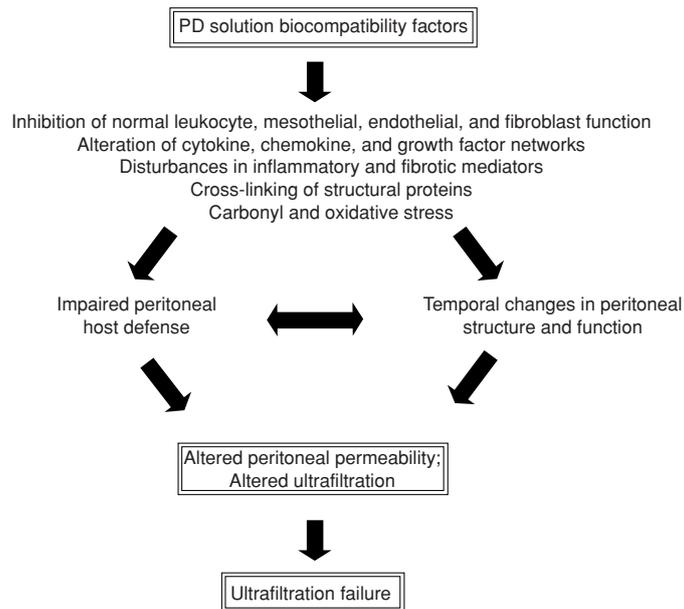


Abb. 8: Einfluss der Biokompatibilität auf peritoneales Ultrafiltrationsversagen.

Nach Cooker et al, 2002

In klinischen Studien blieben die biokompatiblen PDF jedoch weitgehend hinter den hohen Erwartungen zurück. In wichtigen, klinisch relevanten Endpunkten wie Peritonitis-Rate, Membranfunktion und Patientenüberleben konnten die neuen PDF keinen eindeutigen Vorteil gegenüber den herkömmlichen PD-Lösungen zeigen. Problematisch an diesen Studien ist jedoch die geringe Vergleichbarkeit deren Ergebnisse. Unterschiede in Studien-Design, Indikationsstellung und Lösungszusammensetzung verhindern bislang ein schlüssiges Gesamtbild [78].

Die aktuellste und zugleich überzeugendste randomisierte klinische Studie, die sogenannte balANZ-Trial, kam zu einem insgesamt positiven Ergebnis. So wurde ein Vorteil der biokompatiblen PDF gegenüber den Standardlösungen hinsichtlich Peritonitis- Inzidenz und Erhaltung einer eventuell vorhandenen Restauscheidung festgestellt [79].

Trotz der erzielten Fortschritte bleibt der durch Fibrose und Hypervaskularisation bedingte Ultrafiltrationsverlust nach wie vor der häufigste Grund für ein technisches Versagen bei der langfristigen Peritonealdialyse. 30-50% der PD-Patienten

entwickeln ein UF-Versagen nach sechs Jahren und in bis zu 24% der Fälle ist ein Wechsel des Nierenersatzverfahrens hin zur Hämodialyse notwendig [80].

### **1.4 Enkapsulierende Peritonealsklerose (EPS)**

Neben dem Ultrafiltrationsversagen kann die Fibrosierung des Peritoneums jedoch auch zu einer weiteren, für den Patienten weitaus folgenschwereren Konsequenz führen, der sogenannten enkapsulierenden Peritonealsklerose (EPS). Diese seltene, lebensbedrohliche Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine sklerotische Verdickung des Peritoneums mit konsekutiver Ummauerung und Obstruktion ganzer Darmschlingen, welche bis zum kompletten Ileus führen kann. Histologisch imponiert die EPS durch eine stark verdickte, mit dichtem Bindegewebe sowie Entzündungszellen durchzogene submesotheliale Fibrosierung des gesamten Peritoneums [81].

#### **1.4.1 Epidemiologie**

Obwohl die EPS als sporadische, idiopathische Entität bereits 1907 von Owtschinnikow beschrieben wurde und weiterhin gelegentlich neue Fallberichte veröffentlicht werden, gilt das Auftreten dieser Erkrankung als stark mit der Peritonealdialyse assoziiert [82, 83]. In einer prospektiven Studie in Japan fanden Kawanishi et al eine Gesamtinzidenz der EPS von 2,5% aller PD-Patienten, wobei die Inzidenz stark mit der Dauer der Peritonealdialyse korreliert. So wurde nach 8 Jahren PD-Therapie ein deutlicher Anstieg der Inzidenz auf 5,9% registriert, nach 15 Jahren waren bereits 17,2% der Patienten betroffen. Die Mortalität dieser Erkrankung ist hoch und steigt ebenfalls mit der Dauer der Peritonealdialyse. Kawanishi et al berichten von 28,6% Mortalität nach 8 Jahren PD, 61,5% nach 10 Jahren und sogar 100%, wenn die EPS nach mehr als 15 Jahren PD-Therapie auftrat [84].

Andere epidemiologische Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Johnson et al in Australien veröffentlichten 2009 eine Studie mit 7618 eingeschlossenen PD-Patienten über einen Beobachtungszeitraum von 15 Jahren. Es zeigte sich eine Gesamtinzidenz von 0,4% sowie eine Mortalität von 55% [85], im selben Jahr

fanden Brown et al in Schottland eine Gesamtinzidenz von 1,5%, nach 5 Jahren PD-Dauer sogar 8,8% [86].

Daten aus den USA zeichnen ein ähnliches Bild. Zwei Single-Center Studien berichten von niedrigen Gesamtinzidenzen, welche jedoch mit Dauer der Peritonealdialyse deutlich anstiegen, sowie von insgesamt hoher Morbidität und Mortalität. Bansal et al fanden 2010 eine Inzidenz von 1,2% aller PD-Patienten, welche auf 15% beziehungsweise 38% nach 6 respektive 9 Jahren PD-Dauer anstieg, bei einer Mortalität von 38% [87]. Gayomali et al melden eine Inzidenz von 14% nach 5 Jahren Peritonealdialyse [88].

Interessant ist auch die Beobachtung, dass teilweise mehr als die Hälfte der beobachteten EPS-Fälle erst nach der Beendigung der PD beziehungsweise nach dem Wechsel zur Hämodialyse auftreten. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt und werden unterschiedlich interpretiert [84, 89]. Eine weitere, beunruhigende Entwicklung ist das Auftreten der EPS nach Nierentransplantation, welche oftmals einen besonders fulminanten Verlauf nimmt [90].

#### 1.4.2 Diagnostik

Die Diagnose der EPS fußt auf drei Säulen: klinische Präsentation, radiologische Bildgebung sowie histopathologische Diagnostik.

Das klinische Bild der EPS umfasst die folgenden, typischerweise intermittierenden Symptome:

- Inappetenz
- Übelkeit und Erbrechen
- Diarrhö
- Gewichtsverlust
- Obstipation
- abdominelle Schmerzen
- palpable Resistenzen
- Fieber
- Aszites
- (Sub-)Ileus

Die EPS beginnt meist subklinisch und schleichend, Frühsymptome sind oftmals unspezifische abdominelle Beschwerden. Der klinische Manifestationszeitpunkt unterliegt großen Schwankungen und reicht von einem Jahr nach Beginn der Peritonealdialyse bis hin zu mehreren Jahren nach Beendigung selbiger, beziehungsweise nach Transfer zur Hämodialyse. In der Anfangsphase der Erkrankung sind Gewichtsverlust, blutige Dialysatausläufe und Dialyseversagen wichtige Warnhinweise für eine sich entwickelnde EPS, gelegentlich steht auch eine entzündliche Symptomatik mit Fieber und Fatigue im Vordergrund. [91, 92].

Laborchemisch existiert kein Parameter, welcher eine EPS ausschließen oder beweisen könnte. Unspezifisch zeigen sich oftmals erhöhte Entzündungsparameter (Leukozytose, CRP-Erhöhung), eine Erythropoietin-resistente Anämie sowie eine Hypoproteinämie. Im Aszites-Punktat lassen sich verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren nachweisen, zum Beispiel Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ 1 und VEGF, deren Spezifität und Signifikanz jedoch strittig sind [81].

Nakamoto et al schlagen eine Klassifikation der EPS in vier klinische Stadien vor [81]:

- Stadium 1 (prä-EPS-Stadium): Ultrafiltrationsverlust und Entwicklung eines „high transporter“-Status, Hypoproteinämie, blutiger Dialysatauslauf, Aszites, Calcifizierung des Peritoneums
- Stadium 2 (Inflamations-Stadium): CRP- und Leukozyten-Erhöhung, Fieber, blutiger Dialysatauslauf, Aszites, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Diarrhoe
- Stadium 3 (enkapsulierendes oder fortgeschrittenes Stadium): rückläufige Entzündungszeichen, zunehmende Ileus-Symptomatik mit Übelkeit und Erbrechen, Bauchschmerzen, Obstipation, abdominelle Raumforderung, Aszites
- Stadium 4 (Ileus-Stadium): Inappetenz, Ileus, abdominelle Raumforderung

Diese Klassifikation kann als Richtlinie verstanden werden, ist allerdings noch nicht gemeinhin anerkannt.

Die Radiologische Diagnostik umfasst, neben den unzureichenden Durchleuchtungsstudien zur Magen-Darm-Passage, vor allem die deutlich sensitivere Computertomographie. CT-morphologische Zeichen für eine vorliegende EPS sind Adhäsionen und Verwachsungen von Dünndarmschlingen mit begleitender Fettgewebsimbibierung, Einengungen des Darmlumens durch Ummauerung des Intestinums mit Verkalkungen des Peritoneums sowie umschriebene, abgekapselte Flüssigkeitskolektionen (siehe Abb. 9) [93].

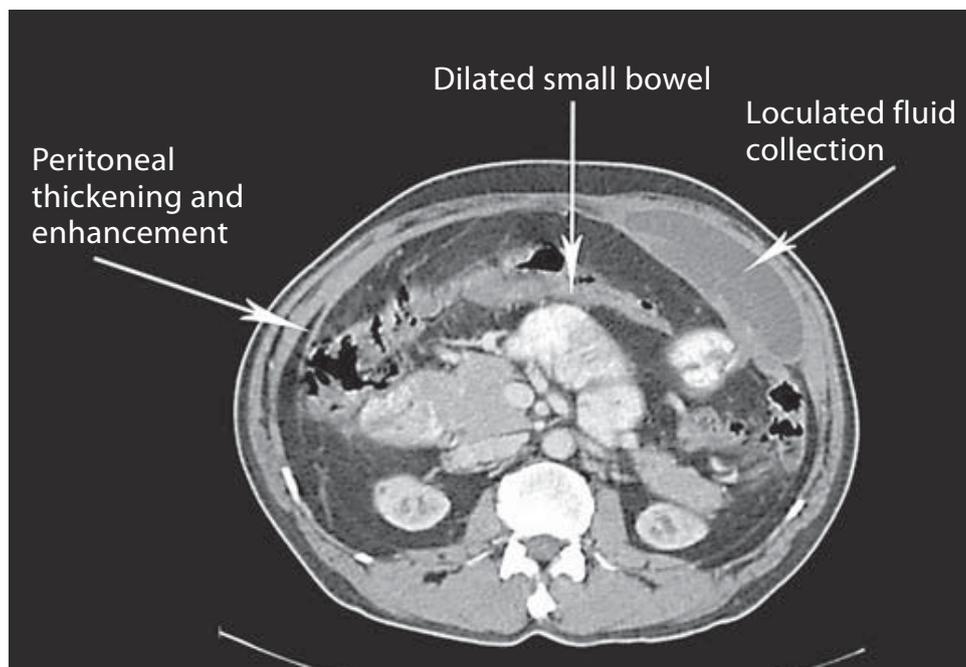


Abb. 9: Computertomographie bei EPS [92]

Histologisch zeigen sich bei der EPS morphologische Veränderungen des Peritoneums. Charakteristisch ist ein kompletter Verlust der Mesothelzellschicht, welche physiologischerweise das Peritoneum bedeckt. Desweiteren zeigen sich Fibrinauflagerungen, ein stark verdicktes, zum Teil kalzifiziertes submesotheliales Interstitium sowie Neoangiogenese mit Vaskulopathie. Entzündliche, monozelluläre

re Infiltrate werden in variablerem Ausmaß gefunden. Dabei fällt auf, dass bei der EPS, im Gegensatz zur einfachen PD-bedingten Fibrose, auch und vor allem das viszerale Peritoneum betroffen ist. Insgesamt sind die histopathologischen Diagnosekriterien der EPS jedoch nicht spezifisch und können auch bei einer einfachen, PD-induzierten Fibrose des Peritoneums auftreten [94]. Braun et al entwickelten erstmals eine standardisierte Prozedur zur histologischen EPS-Diagnostik. Sie konnten spezifische Unterschiede in der Präsentation von PD-Fibrose und EPS ausmachen, dies waren unter anderem die Häufigkeit von Fibroblasten-artigen Zellen (FLC), mesothelialer Denudation, verminderter Zellularität, Fibrinablagerungen und Eisenablagerungen [95].

Eminent wichtig ist die makroskopische Betrachtung des charakteristischen Bildes der EPS durch diagnostische Laparoskopie beziehungsweise Laparotomie. Es zeigt sich typischerweise ein derbes, verdicktes Peritoneum mit Ummauerung von Teilen des Dünndarmkonvolutes sowie Sklerosierungen und Einziehungen der Mesenterialwurzeln (siehe Abb. 10) [96].

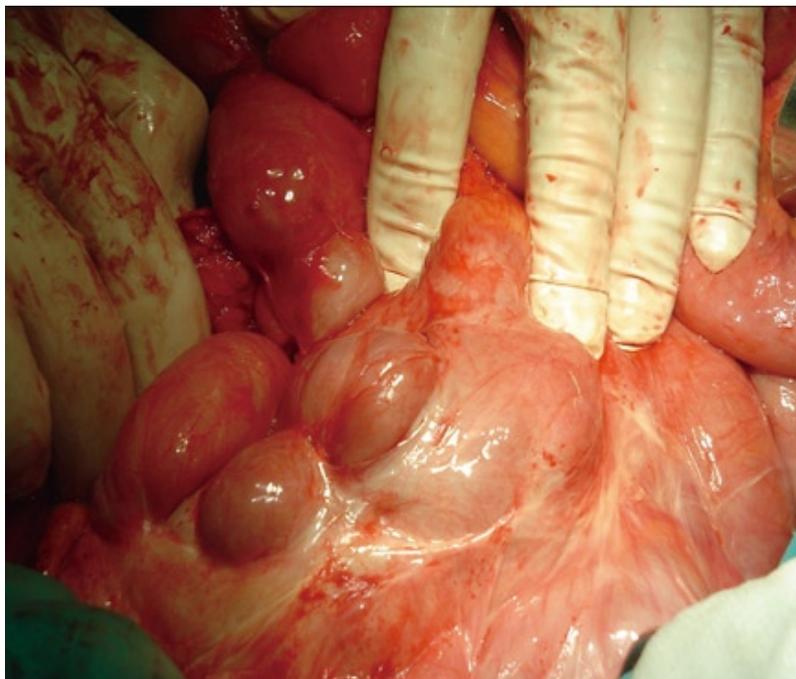


Abb. 10: OP-Situs bei EPS [83]

### 1.4.3 Therapie

Die Therapie der enkapsulierenden Peritonealsklerose stellt Wissenschaftler und Kliniker noch immer vor große Probleme. Da randomisierte Studien zur medikamentösen Behandlung fehlen, basieren Therapieempfehlungen nach wie vor auf einzelnen Fallstudien und retrospektiven Beobachtungen. Neben der Beendigung der Peritonealdialyse ist der Einsatz von Glukokortikoiden möglicherweise sinnvoll, welche sich vor allem in der Frühphase der EPS (Stadium I und II nach Nakamoto et al) als wirksam erwiesen haben. Bei der Dosierung jedoch unterscheiden sich die Empfehlungen zum Teil erheblich [97].

Daneben wird die Verwendung von Tamoxifen diskutiert, einem weithin bekannten Estrogenrezeptor-Modulator. Es wird in erster Linie für die adjuvante Hormontherapie bei rezeptorpositiven Mamma-Karzinomen eingesetzt, besitzt jedoch auch antifibrotische Eigenschaften. Es wird daher auch bei fibrotischen Krankheitsbildern wie der retroperitonealen Fibrose (M. Ormond) oder der Mediastinalfibrose eingesetzt [98]. Eine retrospektive Studie von Korte et al zeigte einen signifikanten Überlebensvorteil von EPS-Patienten nach Tamoxifengabe [99].

Der Einsatz immunsuppressiver Medikamente wird nicht einheitlich bewertet, verlässliche Daten zur Wirksamkeit existieren nicht. [97].

In den fortgeschrittenen Stadien der Enkapsulierung und des Ileus gilt die offene Bauchchirurgie mit totaler Peritonektomie und Adhäsioolyse als einzige, lebensrettende therapeutische Maßnahme [100].

## 1.5 Fragestellung

Trotz erzielter Fortschritte in der EPS-Therapie bleibt diese nach wie vor eine lebensbedrohliche Erkrankung mit hoher Mortalität. Grundlagenforschung zum Zwecke der Identifizierung von „target“-Molekülen für neue therapeutische Ansätze ist daher dringend nötig. Ein Therapieansatz zielt auf das bereits vorgestellte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ab.

Wie bereits erwähnt besitzt das RAAS profibrotische Wirkungen in zahlreichen

Geweben. Anhand verschiedener Tiermodelle wurde die Rolle dieses Hormonsystems in der Entstehung der peritonealen Fibrose und der EPS bereits untersucht. Daten zum Einfluss des RAAS bei der EPS des Menschen sind hingegen äußerst spärlich [101].

Auch die angesprochene Interaktion des Vitamin D-Pathways mit dem RAAS stellt einen potentiellen Ansatz für die Etablierung neuer Therapiestrategien dar, welcher in der bisherigen Literatur noch nicht ausreichende Berücksichtigung erfahren hat [102].

Ziel dieser Studie ist es, die wesentlichen Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit immunhistochemischen Mitteln im menschlichen Peritoneum nachzuweisen. Desweiteren soll durch den Vergleich verschiedener Stadien der peritonealen Fibrose das Verständnis der Beteiligung des RAAS und des Vitamin D-Hormonsystems am Pathomechanismus der EPS verbessert werden, um neue Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Therapie ausfindig zu machen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Es wurden Gewebeproben von insgesamt 49 Patienten histopathologisch untersucht, zuvor wurde von jedem Patienten eine Einverständniserklärung eingeholt. Die Proben stammen aus der Gewebebank der Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart. Einige Gewebe wurden von auswärtigen Häusern übersandt, der überwiegende Teil jedoch als Operationsmaterial im Robert-Bosch-Krankenhaus gewonnen. Sämtliche Proben wurden zur Konservierung routinemäßig in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Die Auswahl der Patienten für diese Arbeit erfolgte in drei Studiengruppen:

- Die erste Gruppe („PD“) beinhaltet Gewebe von 16 Patienten, welche ein Nierenersatzverfahren mittels Peritonealdialyse erhielten (CAPD = continuous ambulatory peritoneal dialysis). Das Gewebe wurde bei der operativen Explantation des PD-Katheters (beispielsweise aufgrund Therapieversagens) oder bei koinzidenteller Herniotomie gewonnen. Es handelt sich um parietale Peritonealgewebe.
- Die zweite Gruppe („EPS“) bilden 15 Patienten mit diagnostisch gesicherter enkapsulierender Peritonealsklerose. Hier erfolgte die Gewebeentnahme bei therapeutischer Peritonektomie, das Gewebe stammt vom viszeralem Peritoneum.
- Die dritte Gruppe („Urämie“) besteht aus Proben von 18 Patienten, welche bislang keine Dialyse erhalten hatten, jedoch aufgrund von Nierenversagen urämisch waren. Die Gewebeprobe wurde während der operativen PD-Katheterimplantation vom parietalen Peritoneum gewonnen.

Urämie stellt bereits einen wesentlichen Stimulus der Fibrosierung des Peritoneums dar. Aus diesem Grund wurde die Urämie-Gruppe als Kontrollgruppe

definiert, um von diesem Ausgangspunkt die zugrunde liegenden, histopathologischen Veränderungen von einer milden, urämiebedingten Fibrose bis hin zum Vollbild der enkapsulierenden Sklerose des Peritoneums zu unterscheiden.

Die Studienpatienten der PD- und der EPS-Gruppe wurden zudem hinsichtlich der durchschnittlichen Dauer der Peritonealdialyse „gematcht“, um die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Einwirkungsdauer der ursächlichen „Noxe“, der Peritonealdialyse, zu gewährleisten.

### 2.2 Histologische Bearbeitung

Die Paraffinblöcke werden zur weiteren histologischen Bearbeitung zunächst in einer Dicke von 3  $\mu\text{m}$  geschnitten. Dies wurde mit einem Leica RM2055 Mikrotom (Fa. Leica, Deutschland) durchgeführt. Anschließend werden die Gewebeschnitte faltenfrei auf ein Wasserbad übertragen und vorsichtig geglättet. Danach erfolgt das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger, verwendet wurden hier elektrostatische ChemMate<sup>TM</sup>-Objektträger der Fa. DAKO Hamburg, Deutschland. Die beladenen Objektträger werden anschließend zur stabilen Anhaftung der Schnitte bei 56°Celsius über Nacht getrocknet.

Um die Gewebe den wässrigen Lösungen der anschließenden Färbungen zugänglich zu machen, müssen diese entparaffiniert und rehydriert werden. Ersteres erzielt man durch Überführung der Gewebeschnitte in Xylol beziehungsweise den Ersatzstoff Microclear (Fa. Vogel, Deutschland). In dieser Flüssigkeit werden die Objektträger 30 Minuten belassen, bevor sich die sogenannte absteigende Alkoholreihe anschließt. Bei dieser werden die Schnitte nacheinander für jeweils circa eine Minute in 100% Isopropanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol getaucht. Danach können die Schnitte in Wasser oder wässrigen Waschpufferlösungen gespült und kurzfristig aufbewahrt werden.

### 2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) zählt zu den Standardverfahren der histologischen Routinefärbungen. Sie dient in erster Linie der einheitlichen,

orientierenden Darstellung der physiologischen und pathologischen Gewebemorphologie. Die beiden eingesetzten Farbstoffe färben jeweils unterschiedliche zelluläre und extrazelluläre Strukturen. So färbt Hämatoxylin Zellkerne, Ribosomen und andere, basophile Zellstrukturen blauviolett. Eosin hingegen färbt acidophile (= eosinophile) Strukturen wie Zellplasmaproteine und Bindegewebe rötlich. Zusammen ergibt sich die charakteristische, kontrastreiche HE-Färbung.

In dieser Arbeit dient die HE-Färbung vor allem der Identifizierung von Gewebestrukturen und Quantifizierung verschiedener Zellarten sowie zur Bestimmung der Zelldichte in den einzelnen Proben. Es wurde von jeder der 49 Gewebeproben ein HE-Präparat angefertigt. Dabei wurde nach folgenden Einzelschritten verfahren:

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wie oben beschrieben
- fünfminütiges Inkubieren der Gewebeschnitte in Hämalaun (Bezugsquelle: Fa. Merck, Deutschland)
- anschließend gründliches Spülen unter Leitungswasser für fünf Minuten
- Färbung mit Eosin (Bezugsquelle: Fa. Surgipath Medical Industries, USA) für eine Minute
- anschließend kurzes Wässern in Aqua dest
- abschließend aufsteigende Alkoholreihe, nacheinander mit 70% Ethanol, 96% Ethanol und 100% Isopropanol zur Entwässerung, dann Überführung in Microclear

Zur dauerhaften Haltbarmachung der Schnitte werden diese nun in konservierendem Medium eingedeckt. Hierzu wurden sie behutsam mit Tüchern trocken getupft, mit Cytoseal-Deckmedium (Fa. MICROM, Deutschland) betropft und zuletzt mit Deckgläsern möglichst blasenfrei abgedeckt.

### 2.4 Eisenfärbung

Im Rahmen chronisch-pathologischer Prozesse wie der EPS finden sich histologisch häufig Eisenablagerungen im Gewebe. Diese unlöslichen und für den Körper schwer zugänglichen Protein-Eisen-Komplexe bestehen größtenteils aus denaturiertem Ferritin, dem Hauptspeicherprotein für Eisen im Körper. Man bezeichnet diese Komplexe als Hämosiderin, welche häufig von Makrophagen aufgenommen werden. Histologisch imponieren diese als monozelluläre, deutlich gold-braun gefärbte Zellen und werden auch als Siderophagen bezeichnet.

In dieser Studie wurde eine Eisenfärbung aller 49 Gewebeproben durchgeführt, um eine Verwechslung der pathologischen Eisenablagerung im Peritoneum mit der farblich ähnlichen immunhistochemischen Markierung der untersuchten Antigene zu vermeiden.

Die Färbung erfolgte nach dem Standard der Routine-Pathologie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart. Das Färbeprinzip basiert auf der sogenannten Berliner-Blau-Reaktion. Hierbei reagiert das dreiwertige Eisenhydroxid ( $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})_3$ ) des abgelagerten Hämosiderins mit Kaliumhexacyanidoferrat ( $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ ) zu einem tiefblauen Präzipitat mit der Summenformel  $\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ .

Die einzelnen Färbeschritte im Überblick:

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wie oben beschrieben
- 20 minütiges Inkubieren der Schnitte in der Färbelösung, hergestellt erst unmittelbar vor Gebrauch aus 100 ml 2% Kaliumferrocyanid-Lösung und 100 ml 1% Salzsäure-Lösung (beides gebrauchsfertig aus Routine-Pathologie)
- anschließend kurzes Spülen in Aqua dest
- zehnmündige Gegenfärbung mit Kernechtrot (Fa. Waldeck, Deutschland), um eine schwachrote Kernfärbung zu erzielen
- erneutes kurzes Spülen in Aqua dest

- abschließend aufsteigende Alkoholreihe mit 96% Ethanol und 100% Isopropanol zur Entwässerung, dann Überführung in Microclear

Zuletzt werden die Schnitte in konservierendem Medium eingedeckt, wie oben genauer beschrieben.

## 2.5 Immunhistochemische Färbungen

### 2.5.1 Technik und Durchführung

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Moleküle in einem Gewebe. Es basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion und ist in der Lage, die gesuchten Zielmoleküle, meist Peptide oder Proteine, *in loco* nachzuweisen. Für die immunhistochemischen Färbungen in dieser Studie wurde nach dem sogenannten EnVision™-Prinzip verfahren. Hierbei handelt es sich um eine patentierte Färbetechnik, bei der in zwei Schritten eine sehr sensitive und spezifische Färbung erreicht werden kann.

Zunächst wird das nachzuweisende Antigen von einem Primärantikörper spezifisch gebunden (siehe Abbildung 11, „Schritt 1“). An diesen Primärantikörper bindet in einem zweiten Schritt der Sekundärantikörper („Schritt 2“), der gegen Immunglobuline derjenigen Tier-Spezies gerichtet sein muss, aus welcher der Primärantikörper gewonnen wurde. Ist dies nicht der Fall, so ist die Verwendung eines Brücken-Antikörpers notwendig, welcher die Ziel-Spezies des Primärantikörpers binden und seinerseits vom Sekundärantikörper erkannt werden kann. Zur Amplifizierung der Färbung und damit Erhöhung der Sensitivität ist der Sekundärantikörper an ein inertes Dextrangerüst gebunden,

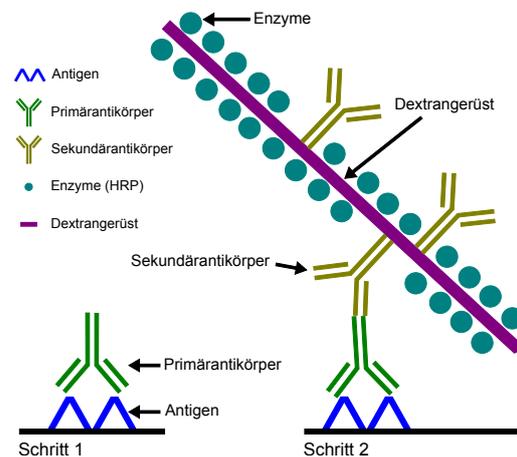


Abb. 11: Prinzip der Färbetechnik

welches eine Vielzahl an Molekülen des Enzyms HRP sowie weitere Sekundärantikörper trägt. Die HRP-Enzyme („Meerrettich-Peroxidasen“) setzen schließlich das Farbstoffsubstrat um und erzeugen somit am Ort des gesuchten Antigens eine Färbung. Diese kann anschließend im Mikroskop betrachtet und ausgewertet werden.

Für diese Arbeit wurden insgesamt 8 Antigene mit beschriebener Technik im Probenmaterial untersucht. Die Färbungen werden in den kommenden Abschnitten genauer beschrieben. Für jede dieser immunhistochemischen Färbungen wurde das DakoREAL™EnVision™Detection-Kit der Fa. DAKO Hamburg, Deutschland, verwendet. Dieses beinhaltet den Sekundärantikörper (anti-Maus und anti-Kaninchen) in gebrauchsfertiger Lösung sowie das Chromogen Diaminobenzidin (DAB-Konzentrat, muss angesetzt werden mit mitgeliefertem Substratpuffer), welches nach Umsetzung durch Meerrettich-Peroxidase als braunes Pigment ausfällt.

Das Procedere der immunhistochemischen Färbung von Hand läuft nach folgendem Algorithmus ab:

- Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte wie oben beschrieben
- gründliches Spülen in TBST-Waschpuffer („tris buffered saline tween“ 80, hergestellt aus 1x TBS und 0,1% Detergenz Tween 80 der Fa. Merck, Deutschland)
- individuelle Vorbehandlung des Gewebes zur Freilegung des jeweiligen Antigens zum Beispiel durch Dampfgaren
- im Anschluss Spülen im Puffer, horizontales Auslegen der Objektträger in einer feuchten Kammer und Abdecken mit Deckgläsern zum Schutz vor Austrocknung während der folgenden Inkubationen
- fünfminütige Inkubation von 100 µl Peroxidase Blocking Solution (Fa. DAKO Hamburg, Deutschland) auf jedem Schnitt (dient der Inaktivierung der endo-

genen (gewebeeigenen) Peroxidase, welche das Chromogen DAB ebenfalls katalysieren und somit ein störendes Hintergrundsignal erzeugen würde)

- Spülen in Aqua dest und TBST
- Ansetzen des Primärantikörpers in Verdünnungsmedium (Fa. DAKO Hamburg, Deutschland) und Inkubation von 100 µl Antikörperlösung je Objektträger über Nacht
- am Folgetag erneutes Spülen in Aqua dest und TBST um ungebundene Antikörper auszuwaschen
- Inkubation von ca 100 µl (zwei Tropfen aus Gebrauchsflasche) Sekundärantikörper für 30 Minuten, anschließendes Spülen in Aqua dest und TBST
- Auftragen von 100 µl DAB-Lösung (wird hergestellt aus 50 µl DAB-Konzentrat mit 1 ml Substratpuffer (beides Fa. DAKO Hamburg, Deutschland), zehnmütiges Inkubieren und anschließendes Spülen unter fließendem Leitungswasser)
- Gegenfärbung mit Hämalaun für 15 Sekunden, um eine schwache, orientierende Kernfärbung zu erzielen, anschließend mindestens fünf Minuten fließend wässern mit Leitungswasser
- zuletzt aufsteigende Alkoholreihe mit 70% Ethanol, 96% Ethanol und 100% Isopropanol zur Entwässerung, schließlich Überführung in Microclear

Abschließend werden die Schnitte in konservierendem Medium eingedeckt, wie oben genauer beschrieben.

Für die vorliegende Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen mit dem Färbeautomaten TechMate<sup>TM</sup>500 Plus (Fa. DAKO Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Hierbei verfährt man zunächst wie in der oben beschriebenen Handfärbung. Nach der Entparaffinierung, Rehydrierung und Vorbehandlung des Gewebes laufen die Schritte automatisch im Färbeautomat ab. In diesem werden die jeweiligen Reagenzien beziehungsweise Spüllösungen durch Kapillarkräfte

zwischen zwei aneinanderliegende Objektträger schonend über die Gewebeschnitte gesogen. Der Kapillarspalt entsteht durch abstandgebende Farbbeschichtung auf der Oberseite der ChemMate<sup>TM</sup>-Objektträger (Fa. DAKO Hamburg, Deutschland), die Spaltbreite beträgt 150 µm. Das Eindecken der gefärbten Schnitte erfolgt von Hand, wie oben beschrieben.

Zusätzlich zu den 49 Gewebeschnitten der Studienpatienten wurde bei jeder Färbung je eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, um die Qualität der Färbung zu evaluieren. Je nach zu untersuchendem Antigen wurden die Gewebe für diese Kontrollfärbungen aufgrund in der Literatur beschriebener Expression des Antigens ausgesucht. Zusätzlich wurde in Vorversuchen per Handfärbung die Antigenrepräsentation im Kontrollgewebe sichergestellt. Bei den Vorversuchen wurde ebenfalls die jeweilige Vorbehandlung der Gewebeschnitte zur Demaskierung des Antigens sowie die notwendige Verdünnungskonzentration des Primärantikörpers ausgetestet.

Für die Negativkontrolle wurde das Kontrollgewebe mit sämtlichen Färbeschritten bearbeitet, anstelle eines Primärantikörpers wurde jedoch ausschließlich das Verdünnungsmedium ohne Antikörper eingesetzt. Dieses Verfahren soll die spezifisch durch den Primärantikörper definierte Färbung demonstrieren und eine eventuelle „Hintergrundfärbung“ beispielsweise durch Kreuzreaktion des Sekundärantikörpers ausschließen.

### 2.5.2 Nachweis von Renin

Der Versuch des immunhistologischen Nachweises von Renin wurde mithilfe eines IgG-Primärantikörpers der Fa. Atlas, Schweden, in 1:200 Verdünnung unternommen. Die Vorbehandlung zur Epitopdemaskierung erfolgte durch Verwendung eines Dampfgarer-Haushaltsgerätes der Fa. Kenwood, Japan. Hierzu wurde eine Pufferlösung mit pH 9 aus einem 10x-Konzentrat der Fa. DAKO Hamburg, Deutschland, hergestellt. Das Pufferkonzentrat wurde 1:10 in Aqua dest verdünnt und 20 Minuten lang vorgewärmt. Anschließend wurden die Gewebeproben 30

Minuten in der Pufferlösung bei pH 9 gegart. Nach zwanzigminütigem Abkühlen wurden die Gewebeschnitte in Aqua dest und schließlich in den Färbeautomat überführt. Als Kontrollgewebe wurde Nierengewebe ausgewählt.

### **2.5.3 Nachweis von Angiotensinogen**

Verwendet wurde ein IgG<sub>3k</sub>-Maus-Primärantikörper gegen Angiotensinogen (AGT, Fa. Abnova Heidelberg, Deutschland). Die Konzentration des Primärantikörpers betrug 1:300 in Verdünnungsmedium. In einer zuvor durchgeführten Austestung wurde festgestellt, dass für dieses Antigen keine Vorbehandlung des Gewebes notwendig ist. Demnach wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung und Rehydrierung direkt in den Färbeautomaten überführt. Für die Kontrollen wurde wiederum Nierengewebe mitgeführt.

### **2.5.4 Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1)**

Die Anfärbung von ACE 1 (Angiotensin Converting Enzyme 1) im untersuchten Gewebe wurde mit einem IgG-Antikörper (Fa. Abcam, UK) in 1:150 Konzentration vorgenommen. Die Vorbehandlung des Gewebes erfolgte im Dampfgerar. Hierzu wurde eine Pufferlösung mit pH 6 hergestellt. Diese Pufferlösung erhält man in 10x-Konzentration von der Fa. DAKO Hamburg, Deutschland. Nach Verdünnung 1:10 in Aqua dest wurde die Lösung für 20 Minuten im Dampfgerar vorgewärmt, bevor die Objektträger mit den Gewebeschnitten hineingegeben wurden. Die Schnitte wurden nun 30 Minuten gekocht, anschließend 20 Minuten in der Pufferlösung bei Raumtemperatur abgekühlt. Schließlich wurden die Schnitte wieder in Aqua dest gestellt und dem Färbeautomaten zugeführt. Es wurde erneut Nierengewebe für die Kontrollen festgelegt.

### **2.5.5 Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2)**

Zur Anfärbung von ACE 2 (Angiotensin Converting Enzyme 2) kam ein IgG-Antikörper der Fa. Abcam, UK, zum Einsatz. Die Verdünnungskonzentration

betrug 1:1000, als Vorbehandlung wurden die Gewebeproben bei pH 9 im Dampfgerar wie oben beschrieben vorbehandelt. Kontrollgewebe war Nierenparenchym.

### **2.5.6 Nachweis des Aldosteron-Rezeptors**

Der Versuch wurde mit einem IgG<sub>1</sub>-Antikörper gegen den Aldosteron-Rezeptor (MCR = Mineralocorticoid-Rezeptor) der Fa. Acris Antibodies Herford, Deutschland, unternommen. Die Verdünnung wurde in Vorversuchen auf 1:150 festgelegt. Die Vorbehandlung des Gewebes erfolgte in pH 6-Pufferlösung im Dampfgerar, wie oben beschrieben. Als Kontrollgewebe wurde Nierengewebe mitgeführt.

### **2.5.7 Nachweis des Vitamin D-Rezeptors**

Die Färbung wurde mit einem IgG<sub>2b</sub>-Primärantikörper gegen den Vitamin D-Rezeptor (VDR, Fa. Acris Antibodies Herford, Deutschland) in 1:100 Verdünnung durchgeführt. Da dieser Antikörper aus Ratten gewonnen wurde, war die Verwendung eines Brücken-Antikörpers notwendig (Rabbit anti-rat Ig Z0147, Fa. DAKO Hamburg, Deutschland). Wiederum erfolgte die Vorbehandlung im Dampfgerar bei pH 6. Die Kontrollen waren Hautgewebeschnitte.

### **2.5.8 Nachweis von TGF- $\beta$ 1**

Die Anfärbung des Transforming-Growth-Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) wurde mittels eines IgG<sub>1</sub>-Primärantikörpers der Fa. AbD Serotec Düsseldorf, Deutschland, durchgeführt. Die Verdünnung betrug 1:2000. Das Gewebe wurde mit der oben beschriebenen Methode des Dampfgerars bei pH 6 vorbehandelt, anschließend im Färbeautomat angefärbt. In Vorversuchen wurde das Testgewebe auf Niere festgelegt.

### **2.5.9 Nachweis von NF $\kappa$ B**

Die Anfärbung des Gewebes erfolgte mit einem IgG<sub>1</sub>-Antikörper gegen die Untereinheit p65 des NF $\kappa$ B-Komplexes (Fa. Santa Cruz Biotechnology Heidelberg,

Deutschland). Die Verdünnung betrug 1:200. Auch hier erfolgte die Vorbehandlung des Gewebes im Dampfgerar bei pH 6. Zur Kontrolle wurde Mamma-Gewebe mitgeführt.

## 2.6 Semiquantitative Auswertung

Die Beurteilung der bearbeiteten Gewebeschnitte erfolgte mit einem Leica DM2000 Mikroskop (Fa. Leica, Deutschland). Sämtliche Schnitte wurden semiquantitativ ausgewertet, die mikroskopisch gewonnenen Informationen werden also nicht in absoluten Zahlenwerten, sondern in relativen Größenordnungen wie etwa *schwach*, *mäßig* oder *stark* wiedergegeben.

Bei der Auswertung wurden folgende Zellarten unterschieden:

- **Fibrozyten** sind langlebige, ortsständige Zellen des Bindegewebes.
- **Fibroblasten** sind aktive Fibrozyten, sie bilden die extrazelluläre Matrix durch Synthese von Kollagen und anderen Proteinen.
- **Mesothelien** sind die physiologischen Epithelien des Peritoneums und bilden dessen Oberfläche. Es handelt sich um ein- bis zweireihiges, kubisches Epithel. Es kann bei entzündlichen oder malignen Prozessen zu einem mehrreihigen, hyperplastischen Epithel proliferieren.
- **Endothelien** bilden die Gefäßinnenhaut und kleiden sämtliche großen und kleinen Blutgefäße aus.
- **Rundzellen** umfassen die mikroskopisch schwer unterscheidbaren Zellarten der Lymphozyten, der Plasmazellen sowie der Makrophagen und Histozyten. Sie stellen das pathologische Korrelat einer chronischen Entzündung mit Beteiligung des adaptiven Immunsystems dar.
- **Granulozyten** sind polymorphkernige Zellen des angeborenen Immunsystems und umfassen die Zellarten der neutrophilen, der eosinophilen und

der basophilen Granulozyten. Sie repräsentieren ein akutes entzündliches Geschehen.

Zusätzlich wurde die **extrazelluläre Matrix (= EZM)** untersucht, welche vorwiegend aus unterschiedlichen Kollagentypen und anderen Glykoproteinen besteht und bei fibrotischen Prozessen deutlich an Masse zunimmt. Andere Gewebe wie Fettgewebe, Muskelgewebe oder Nervengewebe wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

### 2.6.1 Auswertung der HE-Färbung

Die HE-Färbung ist die typische Routinefärbung zur Beurteilung der histologischen Morphologie. In dieser Arbeit wurden die gefärbten Schnitte nach folgenden Merkmalen untersucht:

- Grad der Fibrose 0-3
- Fibroblasten foci 0-3
- Mesotheliale Hyperplasie 0-3
- Mesotheliale Denudation 0/1
- Azelluläre Areale 0/1
- Zellreichtum 0-3
- Gefäßreichtum 0-3
- Vaskulopathie 0/1
- Einblutungen 0-3
- Akute Inflammation 0-3
- Chronische Inflammation 0-3
- Fibrin-Ablagerungen 0-3
- Eisen-Ablagerungen 0-3
- Kalksalz-Ablagerungen 0/1

Parameter mit Wertebereichen von 0-3 geben dabei je nach untersuchtem Merkmal eine Quantität oder Qualität wieder, mit 0 = keine Ausprägung, 1 = milde Ausprägung, 2 = moderate Ausprägung und 3 = starke Ausprägung. Parameter mit Werten von 0/1 geben ein binäres *nein* oder *ja* wieder, je nachdem, ob das entsprechende Merkmal vorhanden ist oder nicht.

### 2.6.2 Auswertung der Eisenfärbung

Mit der Eisenfärbung wurde das Ausmaß der pathologischen Hämosiderin-Ablagerungen bewertet. Dabei wurden die Schnitte komplett durchgemustert und die Quantität der blau gefärbten Ablagerungen bestimmt. Hierzu wurden vier Grade definiert: Grad 0 entspricht keinen sichtbaren Ablagerungen, Grad 1 entspricht vereinzelt kleinen Ablagerungen, Grad 2 entspricht zahlreichen kleinen oder vereinzelt großen Ablagerungen und Grad 3 entspricht zahlreichen großen Hämosiderin-Ablagerungen im untersuchten Gewebe. Die Ergebnisse wurden bei den immunhistochemischen Auswertungen berücksichtigt, um eine Verwechslung von Hämosiderin-Pigmenten und Diaminobenzidin-Färbung zu vermeiden.

### 2.6.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur Bewertung immunhistochemischer Färbungen wird zumeist der sogenannte Immunreaktive Score (IRS) erhoben. Dieser Score ergibt sich aus Menge und Intensität der angefärbten Zellen. Die Menge der angefärbten Zellen wird als prozentualer Anteil der positiven (= angefärbten) Zellen durch Auszählen ermittelt. Für diese Studie wurde in elf Kategorien von 0 bis 10 unterteilt, wobei 0 für keine gefärbten Zellen steht, 1 für 1% bis 10% Anteil positiver Zellen, 2 für 11% bis 20% Anteil positiver Zellen und so weiter, bis 10 für 91% bis 100% Anteil positiver Zellen. Dieser Wert wurde zunächst für jede Färbung als Mittelwert aus der Gesamtheit aller Zellarten bestimmt. Anschließend wurde auch für die einzelnen, oben beschriebenen Zelltypen ein entsprechender Wert erhoben.

Die Intensität der Färbung wurde in vier Grade eingeteilt: Grad 0 bei keiner sichtbaren Färbung, Grad 1 bei schwacher Färbung, Grad 2 bei mäßiger Färbung und Grad 3 bei starker Farbintensität.

Durch Multiplikation der Mittelwerte für die Menge der positiven Zellen und deren Farbintensität wurde für jeden Zelltypus der immunreaktive Score errechnet, welcher folglich Werte zwischen 0 und 30 annehmen kann.

Die extrazelluläre Matrix (EZM) wurde hinsichtlich Intensität und Färbemuster ausgewertet. Die Intensität kann dabei vier verschiedene Grade annehmen: Grad 0

bei keiner sichtbaren Färbung, Grad 1 bei schwacher Färbung, Grad 2 bei mäßiger Färbung und Grad 3 bei starker Färbung. Das Muster der Färbung wurde in *diffus* und *fokal* unterschieden, je nachdem, ob große, flächige Teile der EZM oder nur einzelne, fokale Bereiche angefärbt waren.

Es wurden von jedem Schnitt, falls möglich, fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder, so genannte „High Power Fields“ (= HPF), bei definierter Vergrößerung ausgewertet und anschließend ein Mittelwert berechnet. Bei sehr kleinen Gewebeproben konnten gelegentlich keine fünf Gesichtsfelder verwendet werden, so dass entsprechend weniger HPF ausgewertet wurden. Die Auswahl der HPF erfolgte dabei unselektiv, nach Möglichkeit entsprechend folgendem Schema: zunächst wurde ein Blickfeld mit (sub-)mesothialer Zone aufgesucht und ausgewertet. Anschließend wurden drei Blickfelder ausgelassen, das Darauffolgende wurde ausgewertet, dann weitere drei HPF ausgelassen und so weiter, bis schließlich fünf HPF ausgewertet waren.

Die Natur der immunhistochemischen Methodik birgt den großen Vorteil, die beobachteten Ergebnisse nicht nur in ihrer quantitativen Ausprägung, sondern auch in ihrer örtlichen Lokalisation darstellen zu können. Pathologische Veränderungen können daher oftmals genauen Gewebearten und Zelltypen zugeordnet werden, auch der Ort dieser Veränderungen innerhalb des strukturellen Aufbaus eines Organs kann beschrieben werden. Als Nachteil bringt dies mit sich, dass durch rein zufällige Selektion der ausgewerteten Areale eines Gewebeschnittes wesentliche pathologische Veränderungen übersehen werden können, weil sich diese nur in bestimmten Bereichen innerhalb des untersuchten Organs abspielen.

Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde für Untersuchungen dieser Art das Konzept der „region of interest“ erdacht. Durch Vorabbetrachtung der angefärbten Gewebeschnitte wird in einer groben Vorauswertung festgestellt, welche Arten von Gewebe und welche spezifischen Zellarten aufgrund ihrer Präsentation des gesuchten Antigens angefärbt wurden. Dabei vorgefundene

Farbintensitäten werden in verschiedene Grade definiert und dokumentiert. Auch wird untersucht, ob sich die angefärbten Zellen und Gewebe gleichmäßig über den Gewebeschnitt verteilen, oder ob es offensichtliche Areale von besonderem Interesse gibt, in denen die Färbung besonders stark oder schwach ausgeprägt ist. Anhand dieser Vorauswertung werden also die in der eigentlichen Auswertung zu berücksichtigenden Zell- und Gewebearten und deren Intensitätsgrade festgelegt, sowie eventuell nach obiger Maßgabe eine „region of interest“ definiert.

Die genauen Auswertungsschemata für die immunhistochemischen Färbungen in dieser Arbeit wurden gemeinsam mit erfahrenen Klinikern und Pathologen für jede Färbung einzeln festgelegt und werden weiter unten genauer ausgeführt.

## 2.7 Statistische Aufbereitung

Zur Bewertung der erhobenen Daten hinsichtlich ihrer Signifikanz müssen diese nach statistischen Methoden aufbereitet werden. Bis auf eine Ausnahme (s.u.) wurden sämtliche statistischen Tests mit GraphPad Prism Version 5.01 für Windows durchgeführt (GraphPad Software, San Diego USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Je nach Eigenschaft der Variablen (= Merkmale) müssen jeweils verschiedene statistische Verfahren (= Tests) verwendet werden. Den überwiegenden Teil der in dieser Arbeit erhobenen Merkmale stellen dabei sogenannte ordinalskalierte Merkmale dar. Ordinalskalen beinhalten Merkmale, deren Ausprägungen in einer bestimmten Reihenfolge sortiert werden können, bei denen aber keine Aussage über den absoluten Abstand zwischen den Ausprägungen gemacht werden kann (= kategoriale Skala). Dies trifft beispielsweise für das semiquantitative Merkmal Intensität zu. Dieses Merkmal kann je nach Ausprägung *schwach*, *mäßig* oder *stark* in eine hier offensichtliche Rangfolge gebracht werden, jedoch sind mathematische Aussagen wie arithmetische Mittelwerte oder Standardabweichungen nicht zulässig, da beispielsweise *mäßige* Werte eben *nicht* als Vielfaches *schwacher* Werte angegeben werden können und etwa auch keine „halben“ Werte existieren.

Die erhobenen immunreaktiven Scores (IRS) sind allesamt ebenfalls ordinal-

kalierte Variablen. Zulässige Aussagen über diesen Score sind beispielsweise Mediane und Perzentilen. Um Aussagen über Unterschiede der IRS zwischen den drei Studiengruppen dieser Arbeit machen zu können, wurden diese mit dem sogenannten Kruskal-Wallis Test ausgewertet.

Das Ergebnis des Testes ist ein sogenannter p-Wert. Je niedriger dieser Wert ist, vereinfacht ausgedrückt, desto unwahrscheinlicher ist das beobachtete Ergebnis ein Zufallsprodukt. In wissenschaftlichen Arbeiten gilt ein Ergebnis üblicherweise dann als statistisch signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit eines Zufallsereignisses unter 5% liegt, also der p-Wert kleiner als 0.05 ist. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das untersuchte Merkmal mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit einer unabhängigen Verteilung in den verglichenen Grundgesamtheiten folgt. Dies wird als 95%-Konfidenzbereich bezeichnet. Als besonders signifikant gelten p-Werte kleiner 0.01 und als höchst signifikant p-Werte kleiner 0.001.

Im Falle eines signifikanten Ergebnisses wird der Kruskal-Wallis Test durch den sogenannten Dunn's Multiple Comparison Test ergänzt, welcher die Gruppen einzeln gegeneinander testet und ebenfalls einen p-Wert ausgibt.

Für *diskrete* oder *stetige* Merkmale, welche das Skalenniveau der Kardinalskalen erreichen, stehen Tests zur Varianzanalyse zur Verfügung (analysis of variance, ANOVA). Kardinalskalen geben, im Gegensatz zu den Ordinalskalen, nicht nur Auskunft über die Reihenfolge der Merkmalswerte, sondern auch über den genauen Abstand der Werte zueinander. Ein Beispiel für eine Kardinalskala mit *diskreten* (= ganzzahligen) Variablen ist etwa die Anzahl der Peritonitiden der Studienteilnehmer. *Stetige* Variablen sind reelle Zahlen, also solche Zahlen, die mit Nachkommastellen angegeben werden können. Beispielhaft für eine Kardinalskala mit *stetigen* Variablen seien die ausgewerteten Laborparameter genannt. Es existiert in beiden Beispielen zudem ein „echter“, absoluter Nullpunkt, sodass hier von einer Verhältnisskala gesprochen wird. Hierbei handelt es sich um das höchstmögliche Skalenniveau, Mittelwerte, Standardabweichungen und mathematische Transformationen sind zulässig.

Zeigen sich in der Varianzanalyse signifikante Abweichungen, so wird auch in diesem Fall ein Post-Test durchgeführt. In dieser Arbeit wurde für die kardinalskalierten Variablen der sogenannte Dunnett's Multiple Comparison Test verwendet, welcher die einzelnen Gruppen im direkten Vergleich testet.

Manche Merkmale wurden nur zwischen zwei der insgesamt drei Studiengruppen untersucht, weil diese Merkmale nur in diesen beiden Gruppen erhoben wurden. Dies war zum Beispiel der Fall bei der Auswertung der Mesothelien, da in keiner Gewebeprobe der EPS-Gruppe intakte Mesothelien gefunden werden konnten.

Für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben mit *ordinalskalierten* Daten wie im Falle der Mesothelien-IRS ist der sogenannte Mann-Whitney Test geeignet. Dieser Test entspricht im Wesentlichen dem Kruskal-Wallis Test, letzterer ist jedoch nur für drei oder mehr Stichproben valide.

*Kardinalskalierte* Variablen, welche lediglich in zwei Gruppen erhoben wurden, wurden mithilfe eines zweiseitigen t-Testes für unabhängige Stichproben statistisch ausgewertet. Beispielhaft sei etwa die Dauer der Peritonealdialyse genannt, welche per definitionem in der Urämie-Gruppe noch nicht durchgeführt worden war.

Einige wenige untersuchte Merkmale dieser Studie sind rein nominalskalierte Werte. Dies sind Merkmale, welche zwar in verschiedene Ausprägungen eingeteilt werden können, jedoch keine Rangordnung ermöglichen. Dies trifft zum Beispiel auf das Geschlecht der Studienteilnehmer zu, sowie auf das Färbemuster der extrazellulären Matrix. Zur Auswertung wurden diese Werte zunächst in sogenannte Kontingenztafeln sortiert und anschließend mithilfe der R Statistik-Software, Version 2.14.1 getestet.

In Kontingenztafeln werden die absoluten Häufigkeiten der beobachteten Ereignisse nach Ausprägung und nach Studiengruppe getrennt eingetragen. Ein weit hin bekanntes Beispiel einer Kontingenztafel stellt die sogenannte 4-Feldertafel dar. Es stellt sich für den Auswerter nun die Frage, in wie weit das beobachtete

Ergebnis von einer zufällig verteilten Stichprobe abweicht. Zur Beantwortung dieser Frage stehen verschiedene statistische Testverfahren zur Verfügung, eines davon ist der so genannte exakte Fisher-Test. Dieser Test prüft, vereinfacht gesagt, ob zwei oder mehrere Merkmale zweier oder mehrerer Grundgesamtheiten auf gleiche Art verteilt sind. Der Test ist, im Gegensatz zum ähnlich verwendeten Chi-Quadrat Test, auch bei geringem Stichprobenumfang valide.

Das Ergebnis des Testes ist ein exakter p-Wert und gibt an, wie wahrscheinlich das untersuchte Merkmal in beiden Grundgesamtheiten der gleichen Häufigkeitsverteilung folgt. Ist der p-Wert kleiner als 0.05 bedeutet dies, dass das untersuchte Merkmal mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit einer unabhängigen Verteilung folgt, damit gilt das Ergebnis als statistisch signifikant.

### 2.8 Fehlerquellen

Wie jede wissenschaftliche Arbeit birgt die vorliegende Studie eine Reihe von möglichen Fehlerquellen, welche teilweise in der Methodik, teilweise aber auch in der menschlichen Natur begründet liegen. Trotz größter Gewissenhaftigkeit und Sorgfalt können niemals sämtliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden, jede seriöse wissenschaftliche Beobachtung ist in dieser Hinsicht zu hinterfragen.

Eine Übersicht über mögliche Fehlerquellen dieser Arbeit soll folgende Auflistung geben, ohne Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben:

- sample error: sowohl bei der Probengewinnung als auch bei der Auswertung unterliegt das untersuchte Material einer gewissen Selektion, nämlich durch den Chirurgen bei der Entscheidung für den Ort der Exzision, sowie auch beim Auswerter bei der Auswahl der Studienpatienten oder bei der eventuellen Festlegung einer „region of interest“ im untersuchten histologischen Schnitt. Diese Selektion birgt die Gefahr des „sample errors“, das heißt, bereits die Selektionsentscheidung kann den tatsächlichen Sachverhalt verfälschen.

- Artefakte: Artefakte sind durch technischen oder menschlichen Einfluss entstandene, artifizielle Phänomene, welche die Auswertung der Ergebnisse mitunter beeinträchtigen können. Beispielhaft sei die häufig beobachtete Gewebedenaturierung durch die Vorbehandlung bei den immunhistochemischen Färbungen genannt.
- „menschliche Fehler“: bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte können Fehler beim Abzählen der Zellen oder deren Einordnung in Zelltypen zum Beispiel durch starke Hintergrundfärbung der extrazellulären Matrix auftreten.
- weitere: Fehler im Studiendesign, bei der statistischen Auswertung oder bei der Interpretation von Ergebnissen.

## 2.9 Dokumentation der Ergebnisse, Flächenberechnung

Es wurden für jede Auswertung digitale Fotoaufnahmen einzelner Präparate angefertigt, um beispielsweise Farbintensitäten für die IRS zu definieren und zu dokumentieren. Die Aufnahmen wurden mit der CCD-Kamera des verwendeten Leica DM2000 Mikroskops (Fa. Leica, Deutschland) angefertigt und auf dem Laborserver gespeichert.

Zur Berechnung der Schnittfläche für die flächenbezogene Auszählung der Mastzellen in der Renin-Färbung wurde der Slide Scanner Leica SCN400, Fa. Leica, Deutschland verwendet. Mit diesem wurden die 51 gefärbten Objektträger der Renin-Färbung (49 Studienpatienten sowie je eine Positiv- und Negativkontrolle) in 40x Vergrößerung eingescannt und gespeichert. Zur Ausmessung der Fläche wurde die SlidePath Gateway Client<sup>TM</sup>-Software der Fa. Leica, Deutschland verwendet. Hierbei wurden denaturierte Areale und Granulomgewebe nicht mit einbezogen, da diese Gewebeanteile auch bei der Auswertung nicht berücksichtigt worden waren. Die so errechnete Schnittfläche wurde bei der statistischen Aufbereitung der Mastzellauswertung einbezogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klinische Daten

Von jedem Patienten wurden beim Einschluss in die Studie verschiedene persönliche und klinische Daten erhoben, desweiteren eine Blutentnahme durchgeführt. Für diese Arbeit wurden Geschlecht und Alter der Patienten, die Dauer der Peritonealdialyse sowie die Anzahl der im Laufe selbiger aufgetretenen, infektiösen Peritonitiden statistisch untersucht.

Von den 49 Studienpatienten waren insgesamt 34 männlich und 15 weiblich. In der Studiengruppe PD ( $n = 16$ ) waren 10 Männer und 6 Frauen eingeschlossen, in der EPS-Gruppe ( $n = 15$ ) weitere 12 Männer und 3 Frauen und in der Urämie-Gruppe ( $n = 18$ ) waren 12 Patienten männlich und 6 weiblich. Die Geschlechterverteilung wurde mit dem oben erwähnten Verfahren des exakten Fisher-Tests untersucht. Das Ergebnis zeigt eine nicht signifikante Abweichung von einer zufällig verteilten Stichprobe ( $p = 0.5882$ , exakter Fisher-Test).

Das Alter der Patienten wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) auf signifikant abweichende Mittelwerte der Studiengruppen untersucht. Das Ergebnis war nicht signifikant ( $p = 0.1240$ , one way ANOVA).

Die Dauer der Peritonealdialyse wurde mittels eines zweiseitigen t-Tests auf Abweichungen der Mittelwerte zwischen den Studiengruppen PD und EPS untersucht. Es zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied ( $p = 0.5166$ , unpaired t-Test). Dies war im Vorfeld durch Selektion der Patienten beim Einschluss in diese Studie beabsichtigt worden, um die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Beobachtungen zu erhöhen.

Die Auswertung der Anzahl der bis zum Zeitpunkt der Probengewinnung aufgetretenen Peritonitiden mittels t-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen PD und EPS ( $p = 0.4638$ , unpaired t-Test).

Zur Übersicht der klinischen Parameter siehe auch Abbildung 12 auf Seite 54.

### 3.2 Laborparameter

Anhand der bei Studieneinschluss entnommenen Blutproben wurden verschiedene Werte labortechnisch gemessen:

- Leukozyten- und CRP-Konzentration als Entzündungsparameter
- Parathormon, Calcium und Phosphat als Parameter eines Vitamin D-Mangels bzw. sekundären Hyperparathyreoidismus
- Kreatinin und Hämoglobin

Bei keinem dieser untersuchten Laborwerte zeigte sich durch Varianzanalyse ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den drei Studiengruppen. Abbildung 12 zeigt die klinischen Daten und Laborparameter in tabellarischer Form.

Variable	PD	EPS	Urämie	p
n	16	15	18	
Alter (Jahre; MW ± SD)	54.1 ± 15.2	50.9 ± 12.8	60.4 ± 12.4	0.12
PD-Dauer (Monate; MW ± SD)	55.1 ± 21.2	60.0 ± 20.8		0.51
Peritonitis (1:n Monate; MW)	1:46 Monate	1: 38 Monate		0.46
Hb (g/dl; MW ± SD; [13–18])	11.4 ± 1.4	11.1 ± 2.3	10.3 ± 1.3	0.15
Leukozyten (G/l; MW ± SD; [4.0–11.3])	7.4 ± 2.2	7.6 ± 2.6	7.6 ± 2.2	0.94
CRP (mg/dl; MW ± SD; [<1])	7.2 ± 13.1	0.45 ± 0.56	1.5 ± 3.5	0.055
Phosphat (mmol/l; MW ± SD; [0.68–1.68])	1.7 ± 0.7	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3	0.65
Calcium (mmol/l; MW ± SD; [1.90–2.70])	2.3 ± 0.2	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.15	0.46
PTH (pmol/l; MW± SD; [1.1–7.3])	27.1 ± 25	28.4 ± 29.4	26.8 ± 20.1	0.98
Kreatinin (mg/dl; MW ± SD; [0.5–1.4])	8.3 ± 4.0	6.8 ± 3.4	5.9 ± 2.2	0.09

(MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung; [Normbereich])

Abb. 12: Klinische Daten und Laborwerte der Studienpatienten

### 3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung diente in dieser Studie zur Erhebung definierter Parameter, welche im Rahmen der peritonealen Fibrose und der EPS häufig verändert sind. Die Ergebnisse der HE-Auswertung stammen aus bislang unveröffentlichten Daten dieser Arbeitsgruppe und wurden nicht durch den Doktoranden ausgewertet. Es wurden 44 Gewebeproben der 49 Studienpatienten ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die Merkmale der mesothelialen Denudation, der Fibrinablagerung und der Einblutungen in der EPS-Gruppe höchst signifikant höher lagen als in den beiden anderen Gruppen ( $p < 0.001$ ).

Hoch signifikant höhere Werte wiesen die EPS-Patienten bei den Ablagerungen von Hämosiderin-Eisen auf ( $p < 0.01$ ).

Die Werte Fibroblasten-foci, Gefäßreichtum und Rundzellinfiltrate als Zeichen der chronischen Inflammation lagen ebenfalls in der EPS-Gruppe signifikant höher ( $p < 0.05$ ).

Eine Übersicht der Ergebnisse der HE-Färbung gibt Abbildung 13 auf Seite 56.

Variable	PD	EPS	Urämie	p
n	15	15	14	
Mesotheliale Hyperplasie (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	0	0	0	0.32
Mesotheliale Denudation (Verteilung [0/1]; exakter Fisher-Test)	11/4	2/13	10/3	<0.001***
Fibrose (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	2	2	2	0.79
Fibroblasten foci (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	1	1	0	0.01*
Exsudation (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	0	0	0	0.37
Fibrin Ablagerungen (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	0	1	0	<0.001***
Zellreichtum (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	1	2	1	0.08
Azelluläre Areale (Verteilung [0/1]; exakter Fisher-Test)	12/3	9/6	12/2	0.31
Gefäßreichtum (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	1	2	1	0.01*
Vaskulopathie (Verteilung [0/1]; exakter Fisher-Test)	14/1	14/1	14/0	1
Akute Inflammation (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	0	0	0	0.07
Chronische Inflammation (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	1	2	1	0.02*
Einblutungen (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	0	1	0	<0.001***
Kalksalzablagerungen (Verteilung [0/1]; exakter Fisher-Test)	15/0	15/0	14/0	1
Eisenablagerungen (Median [0-3]; Kruskal-Wallis Test)	0	1	0	0.005**

\* = signifikant  
 \*\* = hoch signifikant  
 \*\*\* = höchst signifikant

Abb. 13: Ergebnisse der HE-Färbung

#### 3.4 Immunhistochemische Ergebnisse

Von allen 49 Studienpatienten wurden jeweils acht immunhistochemische Färbungen durchgeführt (entspricht 392 gefärbten Gewebeschnitten) und durch den Doktoranden ausgewertet.

Für jede Färbung wurden verschiedene Auswertungskriterien erarbeitet, nachdem das jeweilige Färbemuster vorab in einer groben Betrachtung gesichtet wurde. In diesen Vorauswertungen wurde beispielsweise festgestellt, welche Zellarten angefärbt waren und demnach bei der Auswertung berücksichtigt werden sollten. Desweiteren wurden per Mikroskopie-Aufnahmen die jeweiligen Intensitäten der einzelnen Färbungen definiert und dokumentiert.

Für alle immunhistochemischen Färbungen wurde zunächst ein „Gesamtwert“ angegeben, der als prozentualer Anteil der angefärbten Zellen im Verhältnis zur Gesamtheit aller Zellen zu verstehen ist. Anschließend wurde nach Zelltypus differenziert ausgewertet und wie oben beschrieben der immunreaktive Score (IRS) berechnet. Die Färbung der extrazellulären Matrix wurde lediglich nach Intensität und Färbemuster bewertet. Die IRS-Werte der drei Studiengruppen wurden dann mittels Kruskal-Wallis-Test wie oben beschrieben statistisch aufbereitet und im Falle eines signifikanten Ergebnisses durch den Dunn's Multiple Comparison Test ergänzt.

Die genauen Auswertungsschemata der einzelnen Färbungen sowie Ausnahmen und Besonderheiten bei der Auswertung und Statistik werden in den Unterkapiteln dieser Färbungen genauer erläutert.

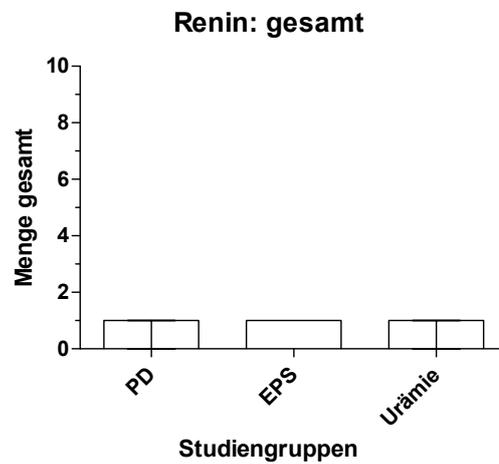
### 3.4.1 Nachweis von Renin

Der Nachweis von Renin im untersuchten Material gelang bei verschiedenen Zellarten. In einer groben Vorauswertung wurden diese Zellarten als Mesothelien, Endothelien sowie zunächst nicht näher differenzierbare, mononukleäre Zellen identifiziert. Desweiteren wurde gelegentlich eine schwache Färbung der extrazellulären Matrix festgestellt.

Anhand der Morphologie und des Verteilungsmusters der angefärbten mononukleären Zellen, sowie aufgrund von Erfahrungswerten aus vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wurde vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um Mastzellen handelt [103]. Zur genaueren Identifizierung wurden bei Gewebeproben mit besonders vielen fraglichen Mastzellen verschiedene histologische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. In der Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Färbung zeigte sich dabei eine stark positive Färbung der fraglichen Zellen. In Verbindung mit Lokalisation und Morphologie wurden diese Zellen fortan, auch bei der Auswertung der Angiotensinogen-Färbung (s.u.), als Mastzellen betrachtet.

Es fanden sich in acht Gewebe der PD Gruppe sowie in elf Gewebe der Urämie-Gruppe intakte Mesothelien, jedoch keine in der EPS-Gruppe. Die Gewebe wurden mit einem 40x-Objektiv untersucht, was einer Gesamtvergrößerung (Okkular und Objektiv) von 400x entspricht. Die Gefäßwerte sind Mittelwerte aus fünf HPF, die Mesothelienwerte Mittelwerte aus dem gesamten Präparat. Mastzellen wurden in absoluter Anzahl im gesamten Präparat abgezählt, durch die Gesamtfläche des Präparates geteilt und in der Einheit  $[1/\text{mm}^2]$  angegeben. Die Gesamtfläche der einzelnen Präparate wurde durch Mikro-Fotographie und anschließendem Ausmessen durch Computer-Software berechnet, genaueres siehe oben.

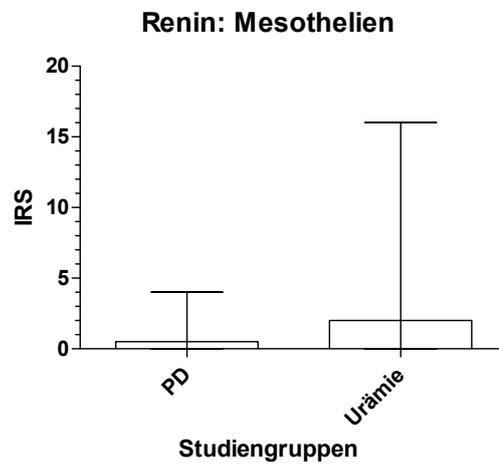
Es zeigten sich weder für den Gesamtwert noch für die einzelnen Zellarten signifikante Ergebnisse, auch die Auswertung des Färbemusters der extrazellulären Matrix ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen ( $p = 0.7143$ , exakter Fisher-Test).



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	1.000	0.0
25% Percentile	1.000	1.000	1.000
Median	1.000	1.000	1.000
75% Percentile	1.000	1.000	1.000
Maximum	1.000	1.000	1.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3539
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

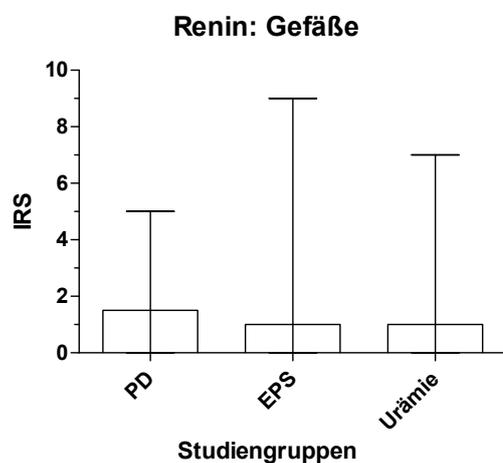
Abb. 14: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit Renin-Antikörpern



	PD	Urämie
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	0.0000
Median	0.5000	2.000
75% Percentile	2.500	4.000
Maximum	4.000	16.00

Mann Whitney test	
P value	0.1737
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No

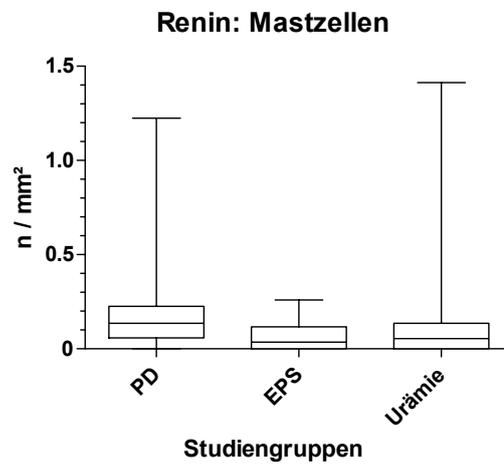
Abb. 15: Immunreaktiver Score der Mesothelien



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	1.000	0.7500
Median	1.500	1.000	1.000
75% Percentile	2.750	3.000	4.000
Maximum	5.000	9.000	7.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.7520
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

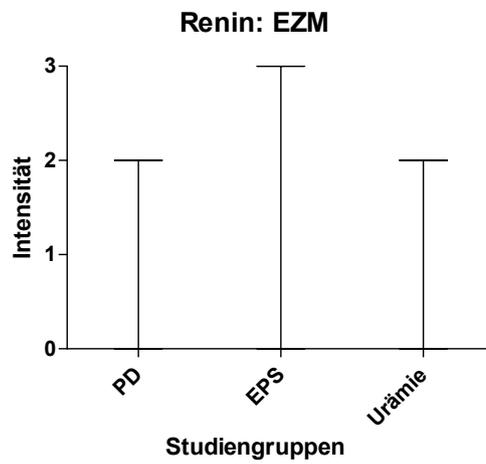
Abb. 16: Immunreaktiver Score der GefäÙe



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.05870	0.0	0.0
Median	0.1351	0.03534	0.05421
75% Percentile	0.2254	0.1163	0.1352
Maximum	1.224	0.2594	1.413

One-way analysis of variance	
P value	0.3320
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

Abb. 17: Anzahl positiver Mastzellen pro mm<sup>2</sup>



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.0	0.0	0.0
75% Percentile	0.0	1.000	0.0
Maximum	2.000	3.000	2.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3267
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 18: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

### 3.4.2 Nachweis von Angiotensinogen

Angiotensinogen-Moleküle wurden erfolgreich nachgewiesen. Mesothelien, Endothelien, Granulozyten sowie zunächst nicht weiter differenzierbare, mononukleäre Zellen wurden teilweise angefärbt. Die extrazelluläre Matrix wurde in unterschiedlicher Intensität markiert.

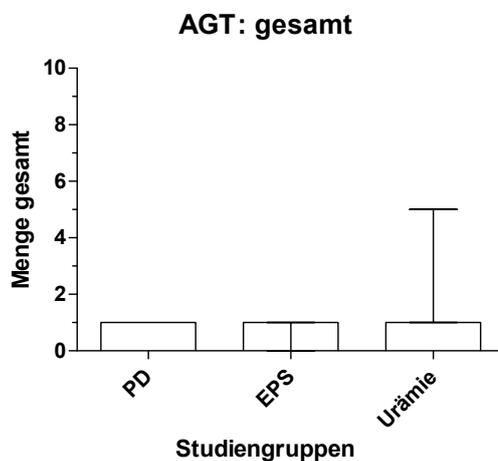
Die mononukleären Zellen wurden entsprechend der im vorherigen Unterkapitel beschriebenen Sachverhalte als Mastzellen identifiziert. Diese waren in variablem Maße deutlich angefärbt, desweiteren wurde ein gehäuftes Vorkommen in perivasalen Gewebeabschnitten beobachtet. Es wurden daher für die Mastzell-Auswertung gezielt perivasale Areale als „region of interest“ aufgesucht und ausgewertet.

Es fanden sich in acht PD- sowie in elf Urämie-Patienten intakte Mesothelien, keine in der EPS-Gruppe. Die Werte der Mesothelien sind Mittelwerte aus dem gesamten Präparat, Gefäßwerte dagegen Mittelwerte aus fünf HPF bei 10x-Objektiv. Mastzellen wurden in fünf selektierten HPF bei 10x-Objektiv, nach Intensität differenziert, ausgezählt. Als Besonderheit bei der AGT-Auswertung wurden hier auch die Granulozyten flächenbezogen ausgezählt und nach Intensitäten getrennt ausgewertet. Intensitäten wurden mit 40x-Objektiv bestimmt.

Die statistische Auswertung zeigte signifikant abweichende Gefäß-IRS. Der durchgeführte Dunn's Post-Test bestätigte signifikant niedrigere IRS in der EPS-Gruppe im Vergleich mit der PD-Gruppe ( $p < 0.05$ ) sowie hoch signifikant niedrigere IRS verglichen mit der Urämie-Gruppe ( $p < 0.01$ ).

Alle übrigen Zellreihen zeigten nicht signifikant abweichende IRS-Werte zwischen den Studiengruppen.

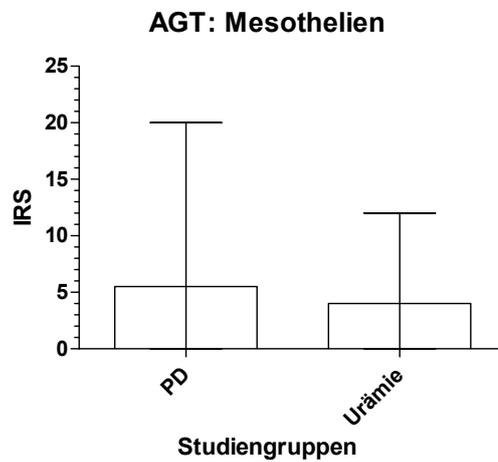
Die Auswertung der EZM-Verteilung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen ( $p = 0.7682$ , exakter Fisher-Test).



	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	0.0	1.000
25% Percentile	1.000	1.000	1.000
Median	1.000	1.000	1.000
75% Percentile	1.000	1.000	1.000
Maximum	1.000	1.000	5.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2307
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

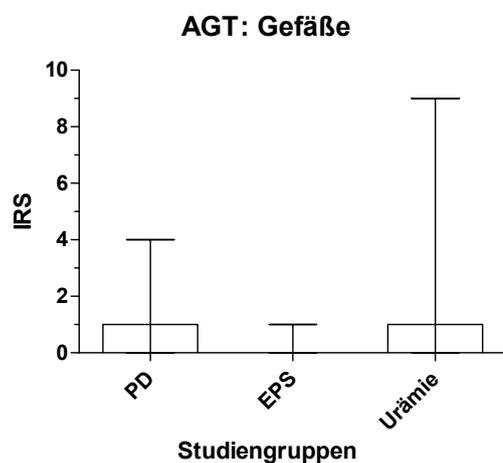
Abb. 19: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit AGT-Antikörpern



	PD	Urämie
Minimum	0.0000	0.0000
25% Percentile	0.0000	1.000
Median	5.500	4.000
75% Percentile	9.500	8.000
Maximum	20.00	12.00

Mann Whitney test	
P value	0.9668
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No

Abb. 20: Immunreaktiver Score der Mesothelien

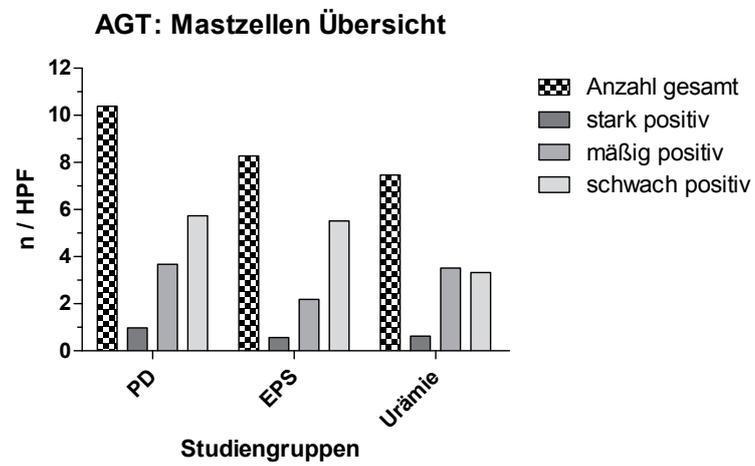


	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	1.000	0.0	1.000
75% Percentile	1.000	0.0	2.000
Maximum	4.000	1.000	9.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

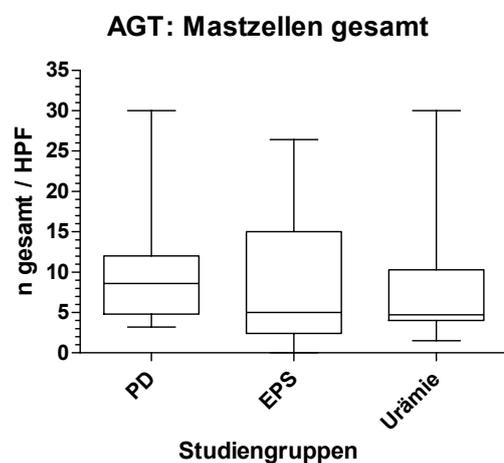
	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	13.48	Yes	*
PD vs Urämie	-0.8542	No	ns
EPS vs Urämie	-14.33	Yes	**

Abb. 21: Immunreaktiver Score der GefäÙe



	Anzahl gesamt	stark positiv	mäßig positiv	schwach positiv
PD	10.38	0.97	3.67	5.74
EPS	8.27	0.57	2.18	5.52
Urämie	7.46	0.62	3.52	3.33

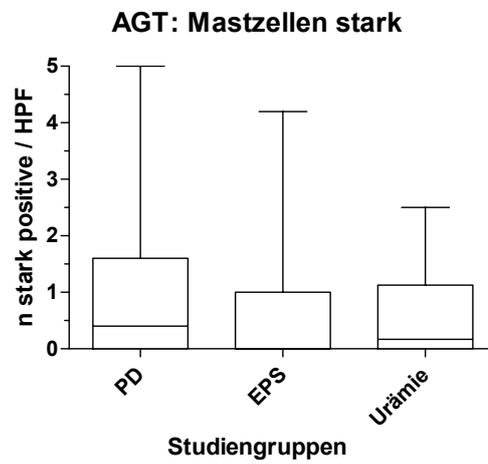
Abb. 22: Übersicht: AGT-positive Mastzellen pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	3.200	0.0	1.500
25% Percentile	4.800	2.400	3.998
Median	8.600	5.000	4.710
75% Percentile	12.00	15.00	10.28
Maximum	30.00	26.40	30.00

One-way analysis of variance	
P value	0.5193
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

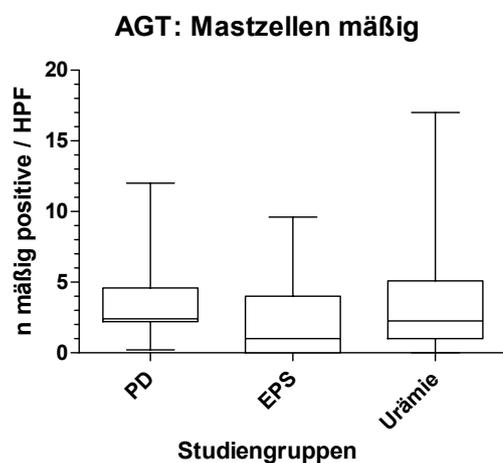
Abb. 23: Gesamtzahl positiver Mastzellen pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.4000	0.0	0.1667
75% Percentile	1.600	1.000	1.125
Maximum	5.000	4.200	2.500

One-way analysis of variance	
P value	0.5631
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

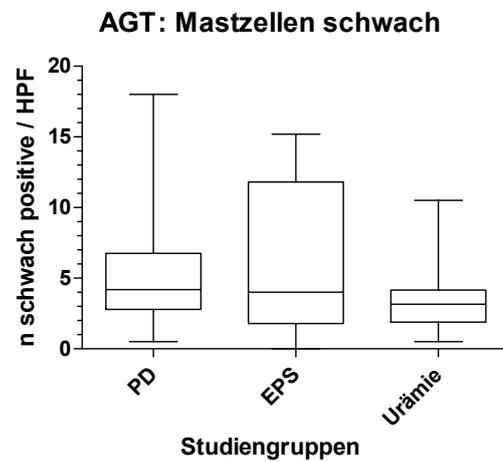
Abb. 24: Anzahl stark positiver Mastzellen pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.2000	0.0	0.0
25% Percentile	2.200	0.0	1.000
Median	2.400	1.000	2.250
75% Percentile	4.600	4.000	5.083
Maximum	12.00	9.600	17.00

One-way analysis of variance	
P value	0.4216
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

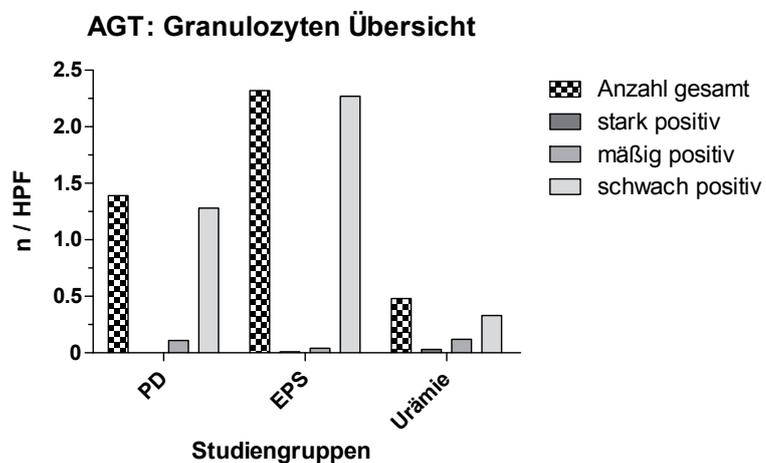
Abb. 25: Anzahl mäßig positiver Mastzellen pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.5000	0.0	0.0
25% Percentile	1.400	1.000	0.5000
Median	2.200	2.200	1.167
75% Percentile	3.800	6.200	2.063
Maximum	8.800	11.40	5.500

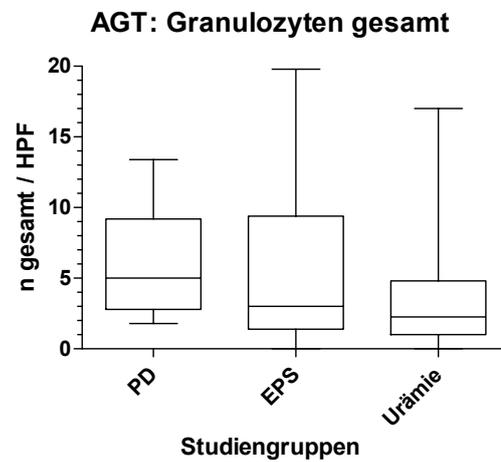
One-way analysis of variance	
P value	0.0551
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

Abb. 26: Anzahl schwach positiver Mastzellen pro Gesichtsfeld



	Anzahl gesamt	stark positiv	mäßig positiv	schwach positiv
PD	1.39	0.00	0.11	1.28
EPS	2.32	0.01	0.04	2.27
Urämie	0.48	0.03	0.12	0.33

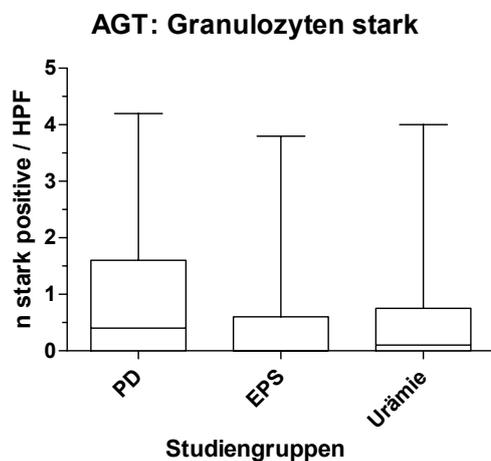
Abb. 27: Übersicht: AGT-positive Granulozyten pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.800	0.0	0.0
25% Percentile	2.800	1.400	1.000
Median	5.000	3.000	2.250
75% Percentile	9.200	9.400	4.800
Maximum	13.40	19.80	17.00

One-way analysis of variance	
P value	0.2755
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

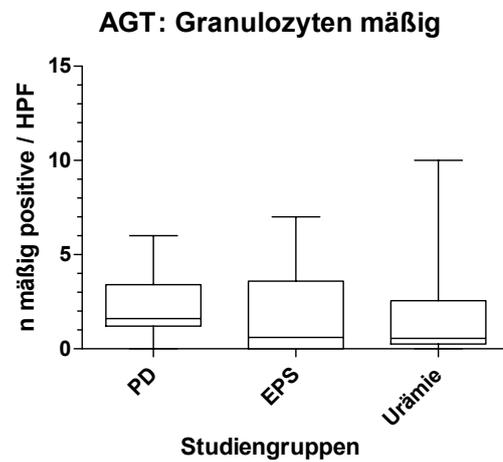
Abb. 28: Gesamtzahl positiver Granulozyten pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.4000	0.0	0.1000
75% Percentile	1.600	0.6000	0.7500
Maximum	4.200	3.800	4.000

One-way analysis of variance	
P value	0.6331
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

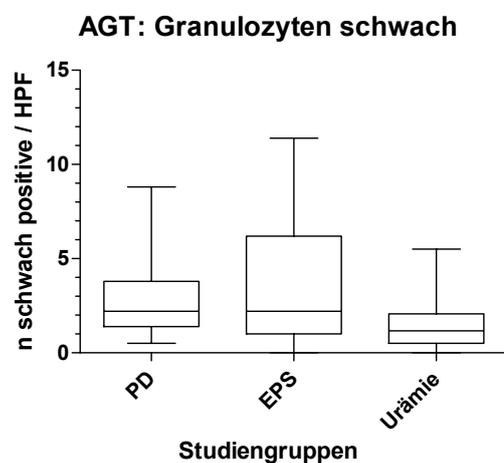
Abb. 29: Anzahl stark positiver Granulozyten pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	1.200	0.0	0.2500
Median	1.600	0.6000	0.5500
75% Percentile	3.400	3.600	2.550
Maximum	6.000	7.000	10.00

One-way analysis of variance	
P value	0.8330
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

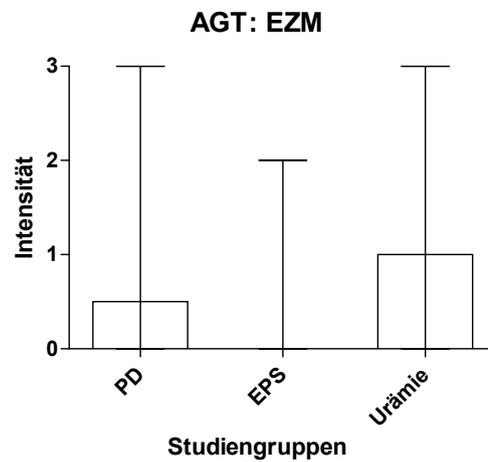
Abb. 30: Anzahl mäßig positiver Granulozyten pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.5000	0.0	0.0
25% Percentile	1.400	1.000	0.5000
Median	2.200	2.200	1.167
75% Percentile	3.800	6.200	2.063
Maximum	8.800	11.40	5.500

One-way analysis of variance	
P value	0.0551
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No

Abb. 31: Anzahl schwach positiver Granulozyten pro Gesichtsfeld



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.5000	0.0	1.000
75% Percentile	1.000	1.000	1.250
Maximum	3.000	2.000	3.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.3898
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

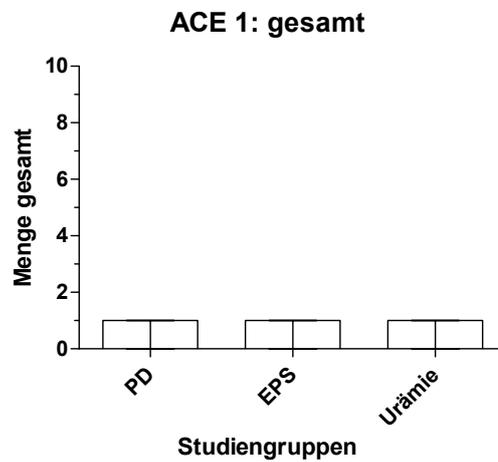
Abb. 32: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

### 3.4.3 Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1)

ACE 1 wurde ausschließlich in Endothel-Zellen gefunden, Mesothelien waren negativ. Gelegentlich wurde eine Anfärbung der extrazellulären Matrix verzeichnet.

Zur Auswertung wurden fünf Gesichtsfelder bei 20x-Objektiv herangezogen. Intensitätsbestimmungen erfolgten bei 40x-Objektiv.

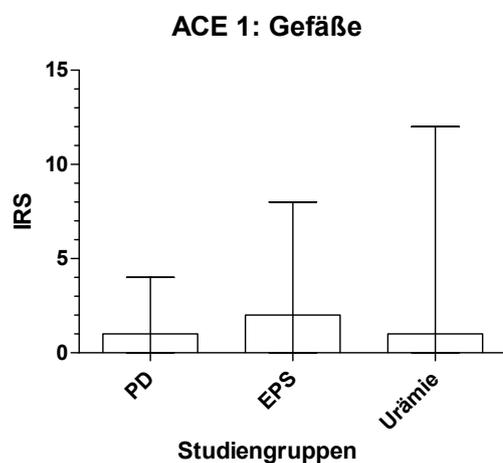
Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Gefäß-IRS und die EZM-Intensitäten zwischen den Studiengruppen. Die Auswertung des EZM-Verteilungsmusters ergab kein signifikantes Ergebnis ( $p = 1$ , exakter Fisher-Test).



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	1.000	0.5000
Median	1.000	1.000	1.000
75% Percentile	1.000	1.000	1.000
Maximum	1.000	1.000	1.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2356
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 33: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit ACE 1-Antikörpern



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	1.000	0.5000
Median	1.000	2.000	1.000
75% Percentile	2.750	2.000	2.000
Maximum	4.000	8.000	12.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1246
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 34: Immunreaktiver Score der Gefäße



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.0	0.0	0.0
75% Percentile	0.0	1.000	1.000
Maximum	3.000	2.000	2.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.5270
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 35: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

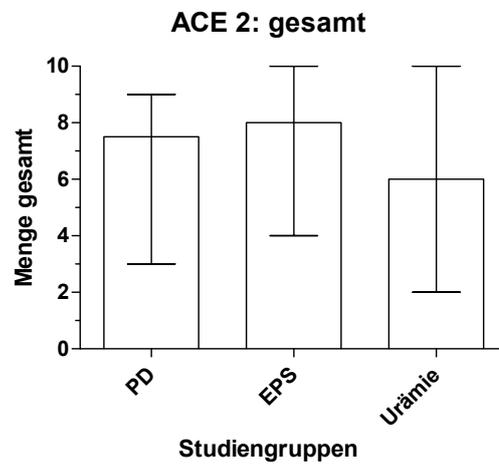
#### 3.4.4 Nachweis von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2)

Der Nachweis von ACE 2 gelang in allen untersuchten Zellarten. Auch die extrazelluläre Matrix war überwiegend angefärbt.

Es wurden Mittelwerte aus fünf HPF bei 20x-Objektiv berechnet, Mesothelien wurden wie üblich im gesamten Präparat ausgewertet. Intakte Mesothelien wurden bei acht PD-Patienten und elf Urämie-Patienten vorgefunden. Detaillierte Intensitätsbetrachtungen erfolgten bei 40x-Objektiv.

Es zeigten sich nach statistischer Auswertung signifikant niedrigere IRS bei Gefäßen der EPS-Gruppe ( $p < 0.05$ ), sowohl im Vergleich mit den PD-Patienten als auch mit der Urämie-Gruppe.

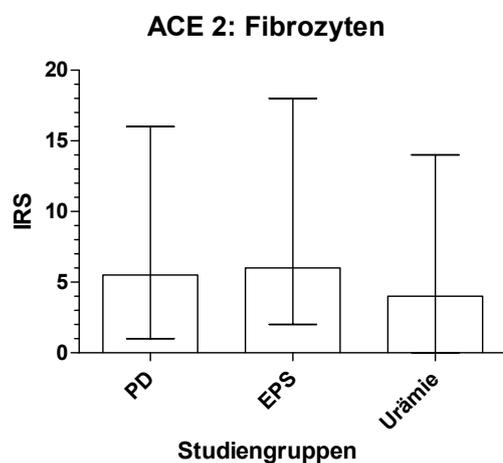
Die übrigen Zellarten sowie die Gesamtmenge waren nicht signifikant verändert. Auch das Ergebnis des EZM-Färbemusters war nicht signifikant ( $p = 0.269$ , exakter Fisher-Test).



	PD	EPS	Urämie
Minimum	3.000	4.000	2.000
25% Percentile	5.000	6.000	4.750
Median	7.500	8.000	6.000
75% Percentile	9.000	8.000	8.000
Maximum	9.000	10.00	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2659
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

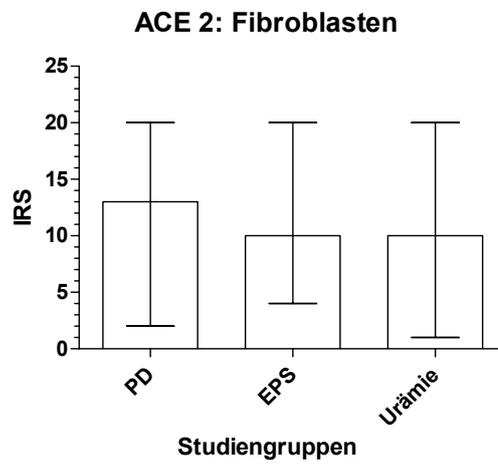
Abb. 36: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit ACE 2-Antikörpern



	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	2.000	0.0
25% Percentile	1.750	4.000	0.7500
Median	5.500	6.000	4.000
75% Percentile	9.500	9.000	6.500
Maximum	16.00	18.00	14.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1823
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

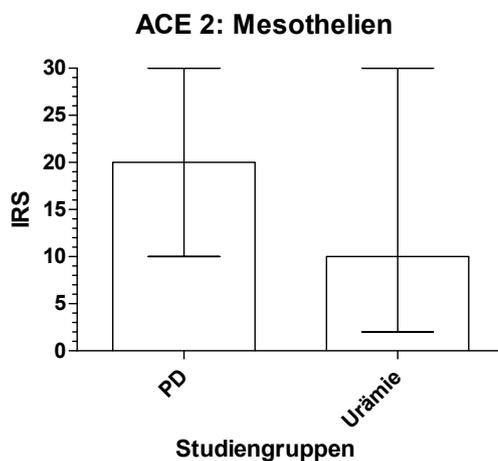
Abb. 37: Immunreaktiver Score der Fibrozyten



	PD	EPS	Urämie
Minimum	2.000	4.000	1.000
25% Percentile	10.00	8.000	2.750
Median	13.00	10.00	10.00
75% Percentile	18.50	16.00	16.00
Maximum	20.00	20.00	20.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1764
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

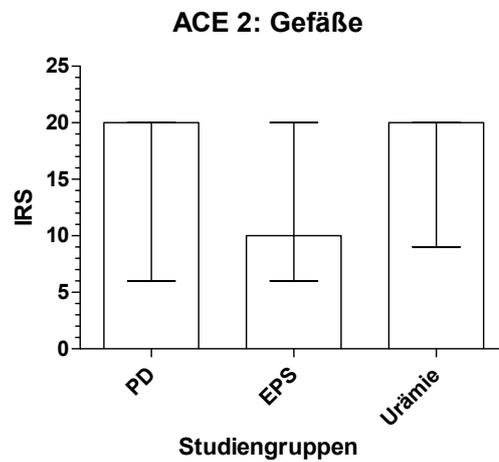
Abb. 38: Immunreaktiver Score der Fibroblasten



	PD	Urämie
Minimum	10.00	2.000
25% Percentile	20.00	9.000
Median	20.00	10.00
75% Percentile	27.50	20.00
Maximum	30.00	30.00

Mann Whitney test	
P value	0.1018
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No

Abb. 39: Immunreaktiver Score der Mesothelien

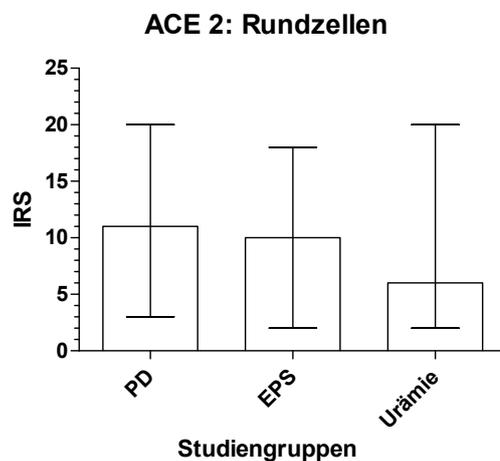


	PD	EPS	Urämie
Minimum	6.000	6.000	9.000
25% Percentile	12.50	9.000	10.00
Median	20.00	10.00	20.00
75% Percentile	20.00	20.00	20.00
Maximum	20.00	20.00	20.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0108
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	11.91	Yes	*
PD vs Urämie	0.3646	No	ns
EPS vs Urämie	-11.55	Yes	*

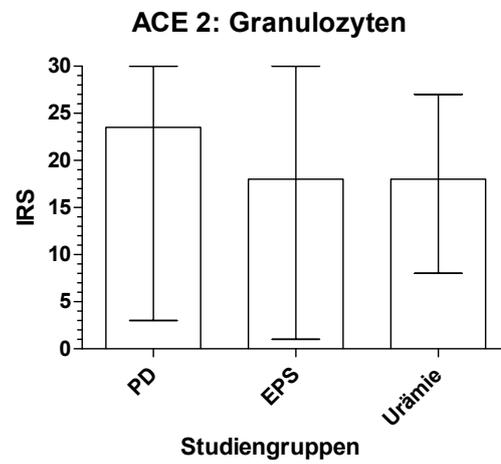
Abb. 40: Immunreaktiver Score der Gefäße



	PD	EPS	Urämie
Minimum	3.000	2.000	2.000
25% Percentile	5.500	6.000	3.000
Median	11.00	10.00	6.000
75% Percentile	18.00	16.00	12.50
Maximum	20.00	18.00	20.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1538
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 41: Immunreaktiver Score der Rundzellen



	PD	EPS	Urämie
Minimum	3.000	1.000	8.000
25% Percentile	15.50	14.00	8.000
Median	23.50	18.00	18.00
75% Percentile	30.00	30.00	20.00
Maximum	30.00	30.00	27.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2998
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 42: Immunreaktiver Score der Granulozyten



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	1.000	1.000	1.000
75% Percentile	2.000	2.000	1.000
Maximum	3.000	2.000	2.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4545
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 43: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

### 3.4.5 Nachweis des Aldosteron-Rezeptors

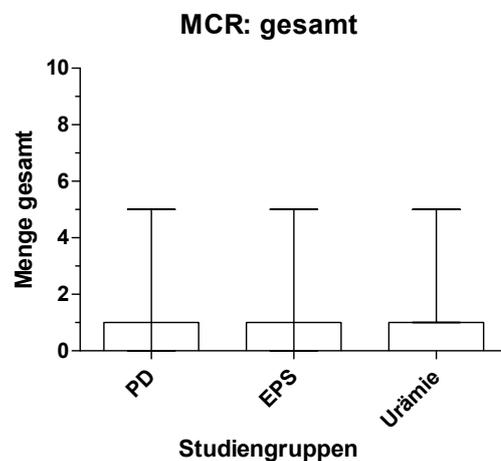
Aldosteron-Rezeptoren (= Mineralocorticoid-Rezeptoren, MCR) wurden überwiegend zytoplasmatisch in Mesothelien, Endothelien und Rundzellen nachgewiesen. Vereinzelt wurden auch Fibrozyten und Fibroblasten angefärbt. Die extrazelluläre Substanz war nur gelegentlich angefärbt, was nahezu ausschließlich in denaturierten Bereichen der Präparate beobachtet wurde und vermutlich ein Artefakt darstellt.

Die Auswertung wurde bei 20x-Objektiv durchgeführt, wie üblich wurden fünf nichtselektierte HPF ausgewertet. Mesothelien wurden im gesamten Präparat aufgesucht und ausgewertet. Insgesamt acht PD-Patienten und elf Urämie-Patienten wiesen intakte Mesothelien im Präparat auf. Intensitätsbestimmungen wurden bei 40x-Objektiv vorgenommen.

Die statistische Analyse zeigte signifikant abweichende Fibroblasten-IRS, was durch den Post-Test nicht bestätigt werden konnte.

Blutgefäße zeigten hoch signifikant abweichende IRS, im direkten Vergleich der Urämie-Gruppe mit der EPS-Gruppe durch den Post-Test wurde dieses Ergebnis bestätigt ( $p < 0.01$ ).

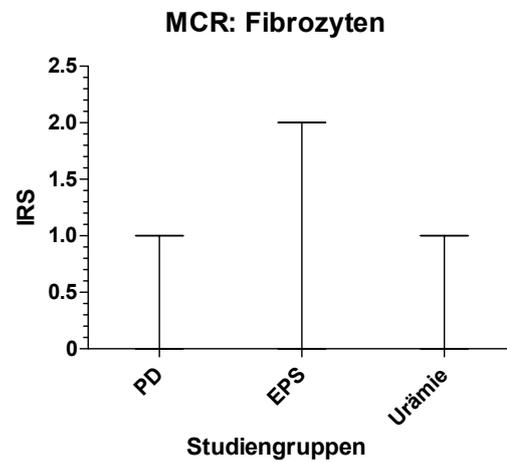
Die Mesothelien-IRS sowie der Gesamtwert waren nicht signifikant verändert.



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	1.000
25% Percentile	1.000	1.000	1.000
Median	1.000	1.000	1.000
75% Percentile	1.000	2.000	2.000
Maximum	5.000	5.000	5.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4857
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

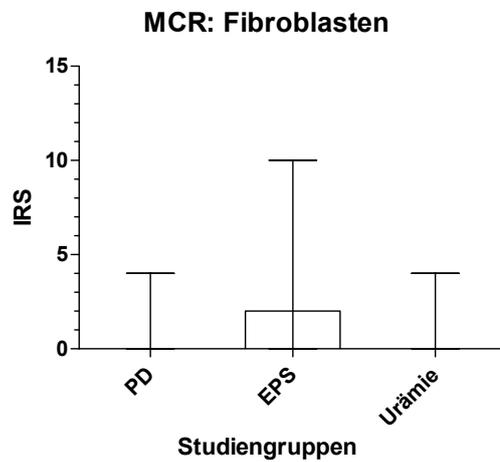
Abb. 44: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit MCR-Antikörpern



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.0	0.0	0.0
75% Percentile	0.0	0.0	0.0
Maximum	1.000	2.000	1.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.9904
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 45: Immunreaktiver Score der Fibrozyten

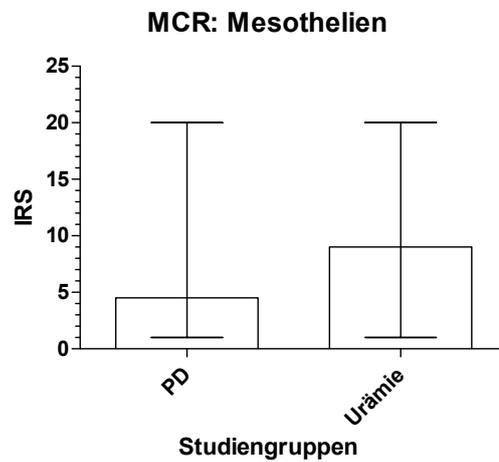


	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	0.0	2.000	0.0
75% Percentile	2.000	4.000	1.000
Maximum	4.000	10.00	4.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0467
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	-8.600	No	ns
PD vs Urämie	2.243	No	ns
EPS vs Urämie	10.84	No	ns

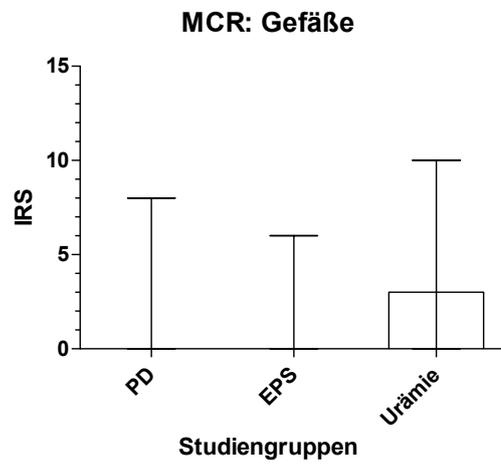
Abb. 46: Immunreaktiver Score der Fibroblasten



	PD	Urämie
Minimum	1.000	1.000
25% Percentile	2.000	3.000
Median	4.500	9.000
75% Percentile	16.00	14.00
Maximum	20.00	20.00

Mann Whitney test	
P value	0.5061
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No

Abb. 47: Immunreaktiver Score der Mesothelien

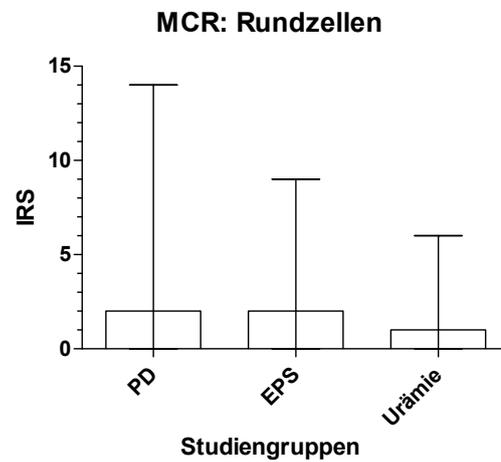


	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.5000
Median	0.0	0.0	3.000
75% Percentile	2.000	1.000	4.500
Maximum	8.000	6.000	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0076
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	**
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	5.333	No	ns
PD vs Urämie	-8.669	No	ns
EPS vs Urämie	-14.00	Yes	**

Abb. 48: Immunreaktiver Score der Gefäße



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.0	0.0
Median	2.000	2.000	1.000
75% Percentile	2.000	4.000	2.000
Maximum	14.00	9.000	6.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2259
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 49: Immunreaktiver Score der Rundzellen

#### 3.4.6 Nachweis des Vitamin D-Rezeptors

Vitamin D-Rezeptoren wurden ubiquitär in nahezu allen Zellen sämtlicher Art mit hoher Intensität angefärbt, gleiches traf auf die extrazelluläre Matrix zu.

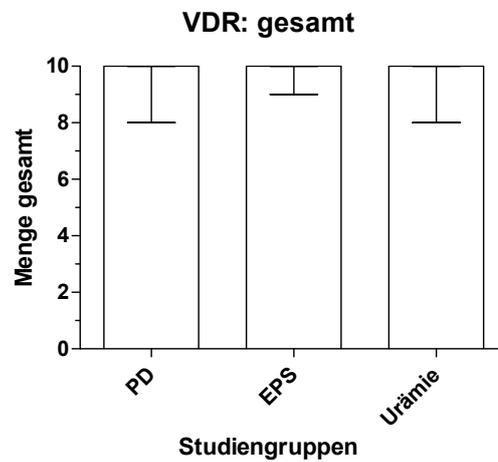
Die Auswertung der fünf zufälligen HPF erfolgte bei 20x-Objektiv, Intensitäten wurden für detailliertere Betrachtung bei 40x-Objektiv ausgewertet. Mesothelien waren bei acht PD- und bei elf Urämie-Patienten vorzufinden.

Da diese Färbung nahezu jede Zelle im kompletten Präparat aller Studienpatienten in sehr homogener Intensität anfärbte, wurde für den VDR-Rezeptor auf die Berechnung des immunreaktiven Scores verzichtet. Stattdessen wird für jede Zellart nur der Anteil der angefärbten Zellen angegeben.

Bei den Fibrozyten zeigte sich statistisch ein signifikant geringerer Anteil gefärbter Zellen in der Urämie-Gruppe im Vergleich mit der EPS-Gruppe ( $p < 0.05$ ).

Auch die Granulozyten zeigten statistisch signifikant niedrigere Werte in der Urämie-Gruppe, verglichen mit den EPS-Patienten ( $p < 0.05$ ).

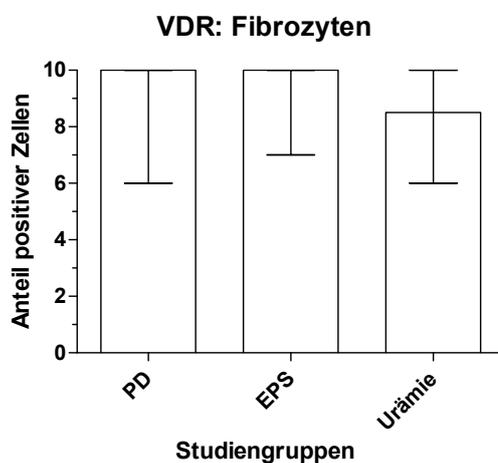
Die extrazelluläre Substanz zeigte keine variierenden Färbemuster, auf diese Auswertung wurde daher verzichtet.



	PD	EPS	Urämie
Minimum	8.000	9.000	8.000
25% Percentile	10.00	10.00	9.000
Median	10.00	10.00	10.00
75% Percentile	10.00	10.00	10.00
Maximum	10.00	10.00	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1922
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 50: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit VDR-Antikörpern

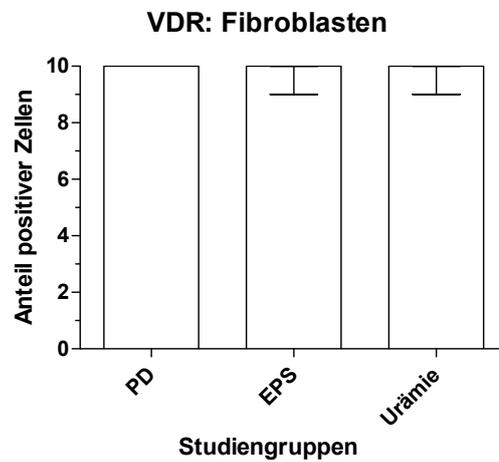


	PD	EPS	Urämie
Minimum	6.000	7.000	6.000
25% Percentile	9.000	10.00	7.000
Median	10.00	10.00	8.500
75% Percentile	10.00	10.00	10.00
Maximum	10.00	10.00	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0317
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	-4.098	No	ns
PD vs Urämie	7.413	No	ns
EPS vs Urämie	11.51	Yes	*

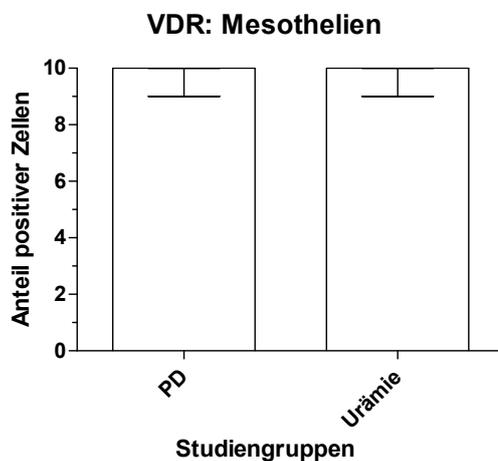
Abb. 51: Anteil angefarbter Fibrozyten



	PD	EPS	Urämie
Minimum	10.00	9.000	9.000
25% Percentile	10.00	10.00	10.00
Median	10.00	10.00	10.00
75% Percentile	10.00	10.00	10.00
Maximum	10.00	10.00	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2083
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

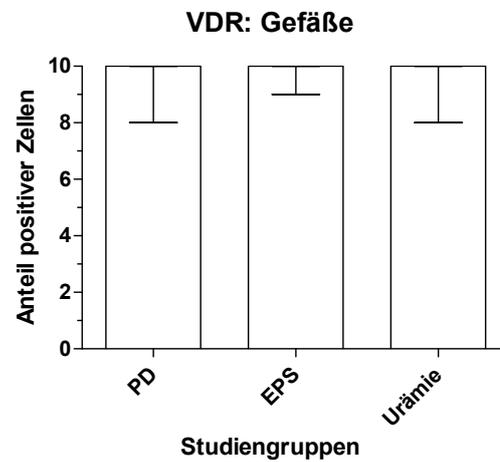
Abb. 52: Anteil angefärbter Fibroblasten



	PD	Urämie
Minimum	9.000	9.000
25% Percentile	10.00	10.00
Median	10.00	10.00
75% Percentile	10.00	10.00
Maximum	10.00	10.00

Mann Whitney test	
P value	0.8767
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No

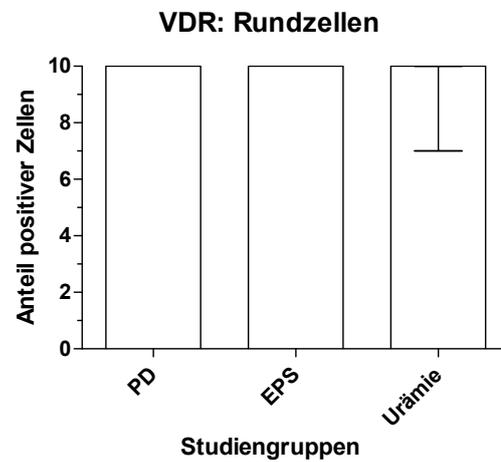
Abb. 53: Anteil angefarbter Mesothelien



	PD	EPS	Urämie
Minimum	8.000	9.000	8.000
25% Percentile	10.00	10.00	10.00
Median	10.00	10.00	10.00
75% Percentile	10.00	10.00	10.00
Maximum	10.00	10.00	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.8876
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

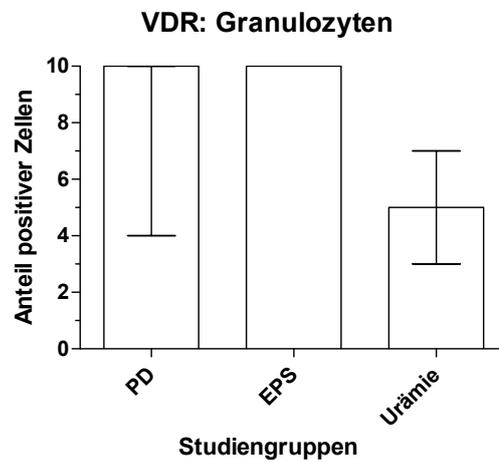
Abb. 54: Anteil angefärbter GefäÙe



	PD	EPS	Urämie
Minimum	10.00	10.00	7.000
25% Percentile	10.00	10.00	10.00
Median	10.00	10.00	10.00
75% Percentile	10.00	10.00	10.00
Maximum	10.00	10.00	10.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4227
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 55: Anteil angefärbter Rundzellen

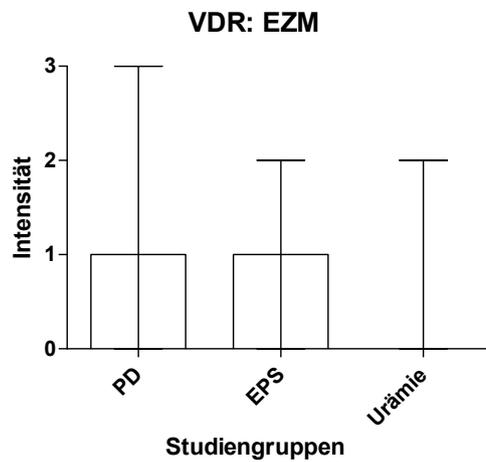


	PD	EPS	Urämie
Minimum	4.000	10.00	3.000
25% Percentile	5.500	10.00	3.000
Median	10.00	10.00	5.000
75% Percentile	10.00	10.00	7.000
Maximum	10.00	10.00	7.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0189
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
PD vs EPS	-1.625	No	ns
PD vs Urämie	4.875	No	ns
EPS vs Urämie	6.500	Yes	*

Abb. 56: Anteil angefärbter Granulozyten



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	1.000	0.0
Median	1.000	1.000	0.0
75% Percentile	1.750	2.000	1.000
Maximum	3.000	2.000	2.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0930
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 57: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

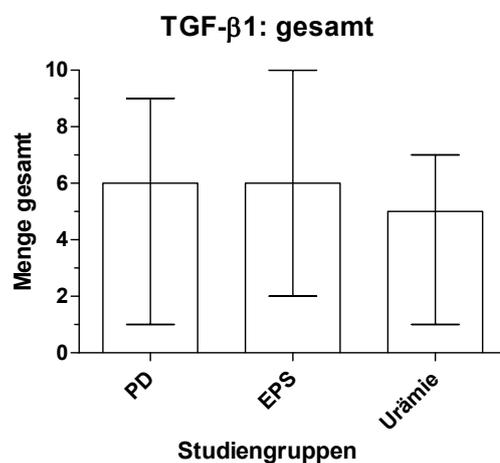
### 3.4.7 Nachweis von TGF- $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 wurde in allen untersuchten Zellreihen nachgewiesen, auch die extrazelluläre Substanz zeigte überwiegend hohe Färbeintensitäten.

Die Auswertung erfolgte bei 20x-Objektiv und wurde für fünf nichtselektierte HPF durchgeführt. Intensitäten wurden bei 40x-Objektiv betrachtet. Mesothelien fanden sich bei acht PD- und elf Urämie-Patienten.

Weder der Gesamt-Wert noch die IRS der einzelnen Zellarten oder die EZM-Intensitäten zeigten nach statistischer Auswertung ein signifikantes Ergebnis.

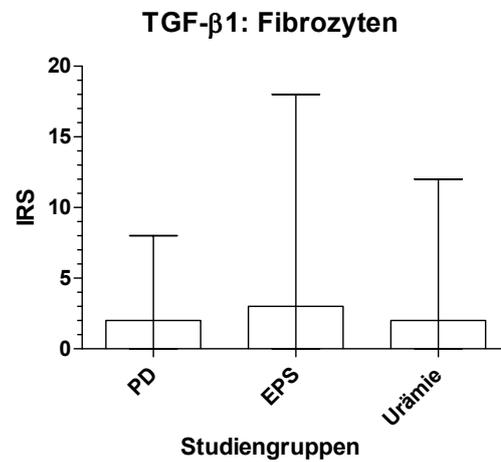
Die EZM-Farbverteilung war ebenfalls nicht signifikant verändert ( $p = 1$ , exakter Fisher-Test).



	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	2.000	1.000
25% Percentile	4.000	5.000	4.000
Median	6.000	6.000	5.000
75% Percentile	7.000	9.000	6.000
Maximum	9.000	10.00	7.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1695
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

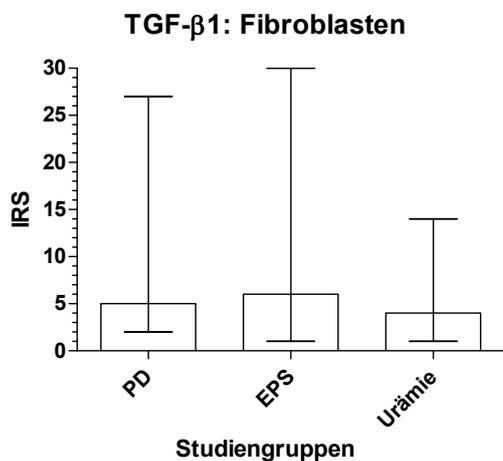
Abb. 58: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit TGF- $\beta$ 1-Antikörpern



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.2500	1.000	1.000
Median	2.000	3.000	2.000
75% Percentile	5.000	10.00	5.000
Maximum	8.000	18.00	12.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.4381
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

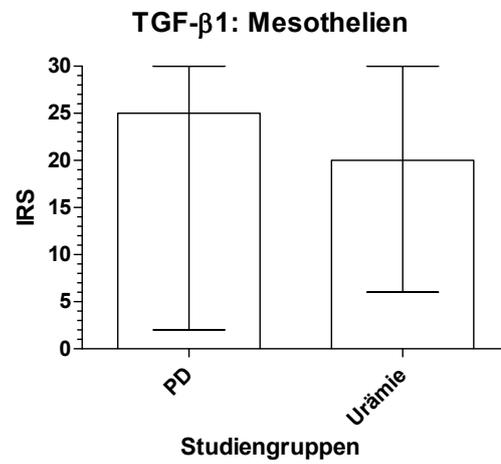
Abb. 59: Immunreaktiver Score der Fibrozyten



	PD	EPS	Urämie
Minimum	2.000	1.000	1.000
25% Percentile	4.000	5.000	2.000
Median	5.000	6.000	4.000
75% Percentile	11.25	18.00	8.000
Maximum	27.00	30.00	14.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0875
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

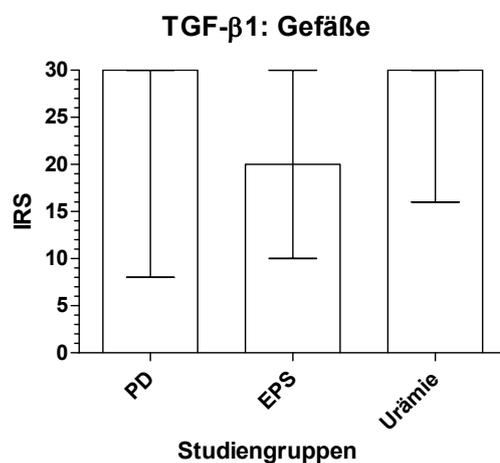
Abb. 60: Immunreaktiver Score der Fibroblasten



	PD	Urämie
Minimum	2.000	6.000
25% Percentile	11.50	7.000
Median	25.00	20.00
75% Percentile	30.00	30.00
Maximum	30.00	30.00

Mann Whitney test	
P value	0.4961
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Are medians signif. different? (P < 0.05)	No

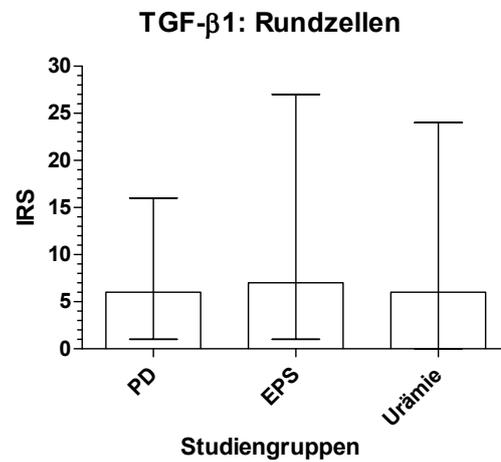
Abb. 61: Immunreaktiver Score der Mesothelien



	PD	EPS	Urämie
Minimum	8.000	10.00	16.00
25% Percentile	20.00	20.00	20.00
Median	30.00	20.00	30.00
75% Percentile	30.00	30.00	30.00
Maximum	30.00	30.00	30.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.5980
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

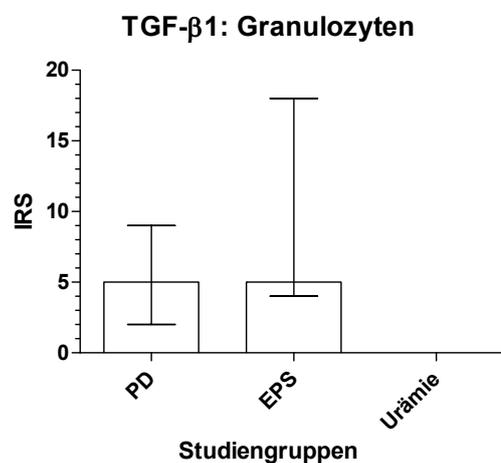
Abb. 62: Immunreaktiver Score der Gefäße



	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	1.000	0.0
25% Percentile	3.000	5.000	3.000
Median	6.000	7.000	6.000
75% Percentile	12.50	18.00	12.00
Maximum	16.00	27.00	24.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2729
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

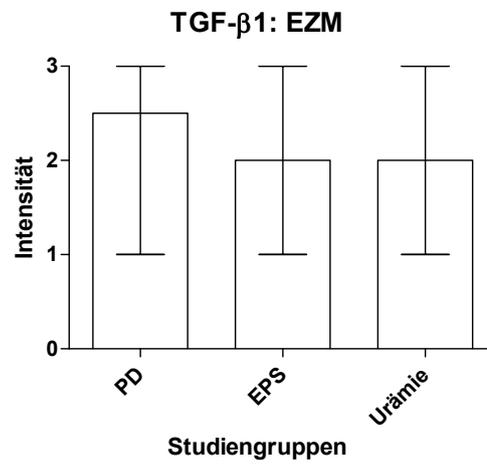
Abb. 63: Immunreaktiver Score der Rundzellen



	PD	EPS	Urämie
Minimum	2.000	4.000	0.0
25% Percentile	2.250	4.000	0.0
Median	5.000	5.000	0.0
75% Percentile	8.500	18.00	0.0
Maximum	9.000	18.00	0.0

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2564
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 64: Immunreaktiver Score der Granulozyten



	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	1.000	1.000
25% Percentile	2.000	2.000	2.000
Median	2.500	2.000	2.000
75% Percentile	3.000	3.000	3.000
Maximum	3.000	3.000	3.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.6143
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 65: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

#### 3.4.8 Nachweis von NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B konnte in allen Zellarten nachgewiesen werden. Auch extrazellulär fand sich eine deutliche Färbung.

Ausgewertet wurden fünf nicht selektierte HPF bei 20x-Objektiv, Intensitäten wurden bei 40x-Objektiv ausgewertet. Es wurden bei acht PD- und neun Urämie-Patienten intakte Mesothelien vorgefunden.

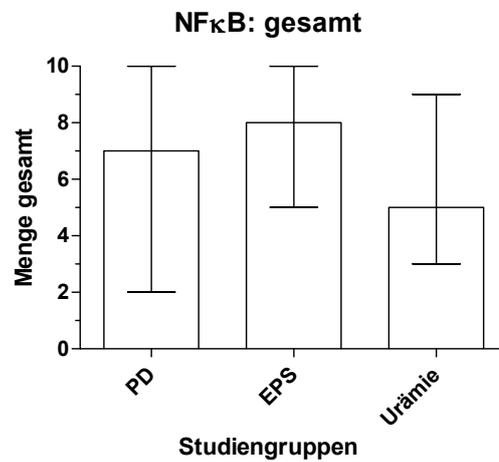
Die statistische Analyse zeigte ein signifikantes Ergebnis bei der Gesamt-Menge der angefärbten Zellen. Der durchgeführte Dunn's Post-Test zeigte im direkten Vergleich hoch signifikant höhere Werte bei den EPS-Patienten gegenüber der Urämie-Gruppe ( $p < 0.01$ ).

Auch die Fibrozyten zeigten signifikant abweichende Werte im Kruskal-Wallis Test. Der Post-Test zeigte daraufhin signifikant höhere Werte in der PD-Gruppe, verglichen mit den Urämie-Patienten ( $p < 0.05$ ).

Bei den Fibroblasten zeigte sich zunächst ein signifikantes Ergebnis, im Post-Test konnte dies jedoch nicht wiederholt werden.

Die Mesothelien-Werte wurden mithilfe des Mann-Whitney Testes analysiert. Es wurden signifikant höhere Werte in der PD-Gruppe festgestellt, im Vergleich zur Urämie-Gruppe ( $p < 0.05$ ).

Das Färbemuster der extrazellulären Matrix zeigte keine signifikante Abweichung von einer zufälligen Verteilung ( $p = 0.7632$ , exakter Fisher-Test).

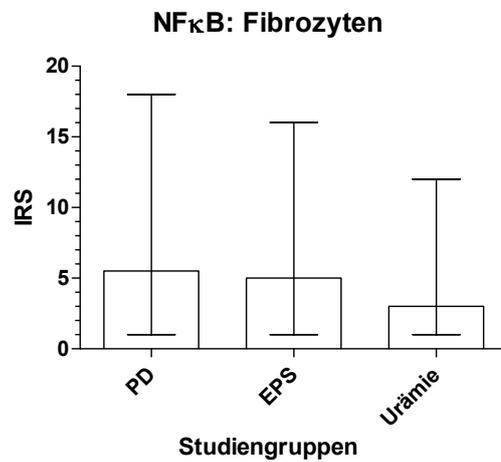


	PD	EPS	Urämie
Minimum	2.000	5.000	3.000
25% Percentile	6.000	6.000	5.000
Median	7.000	8.000	5.000
75% Percentile	7.000	9.000	7.000
Maximum	10.00	10.00	9.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0105
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	-6.192	No	ns
PD vs Urämie	8.375	No	ns
EPS vs Urämie	14.57	Yes	**

Abb. 66: Anteil positiver Zellen nach Anfärbung mit NFκB-Antikörpern

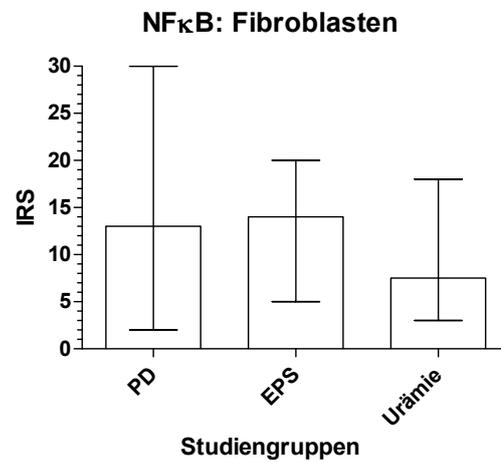


	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	1.000	1.000
25% Percentile	4.000	3.000	1.250
Median	5.500	5.000	3.000
75% Percentile	6.000	10.00	4.000
Maximum	18.00	16.00	12.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0200
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	0.6146	No	ns
PD vs Urämie	12.00	Yes	*
EPS vs Urämie	11.39	No	ns

Abb. 67: Immunreaktiver Score der Fibrozyten

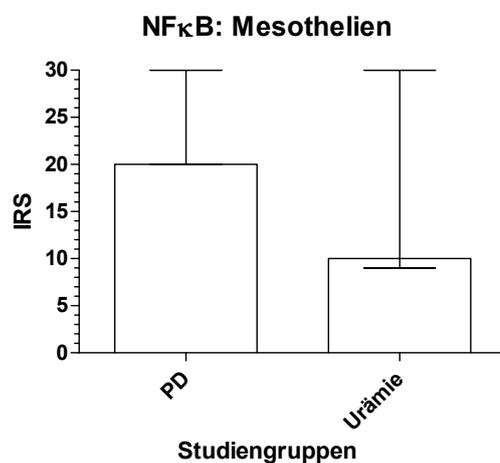


	PD	EPS	Urämie
Minimum	2.000	5.000	3.000
25% Percentile	10.50	7.000	4.250
Median	13.00	14.00	7.500
75% Percentile	15.50	18.00	13.00
Maximum	30.00	20.00	18.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0321
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes

	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Dunn's Multiple Comparison Test			
PD vs EPS	-1.017	No	ns
PD vs Urämie	10.50	No	ns
EPS vs Urämie	11.52	No	ns

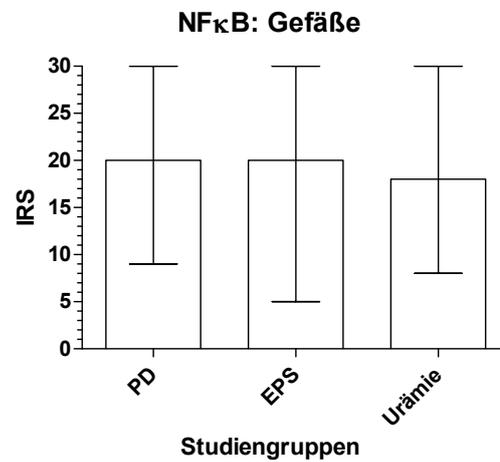
Abb. 68: Immunreaktiver Score der Fibroblasten



	PD	Urämie
Minimum	20.00	9.000
25% Percentile	20.00	9.000
Median	20.00	10.00
75% Percentile	20.00	20.00
Maximum	30.00	30.00

Mann Whitney test	
P value	0.0286
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	*
Are medians signif. different? (P < 0.05)	Yes

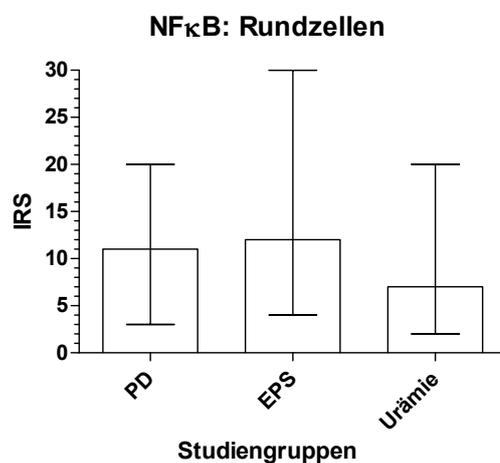
Abb. 69: Immunreaktiver Score der Mesothelien



	PD	EPS	Urämie
Minimum	9.000	5.000	8.000
25% Percentile	20.00	20.00	10.00
Median	20.00	20.00	18.00
75% Percentile	30.00	20.00	20.00
Maximum	30.00	30.00	30.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0682
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

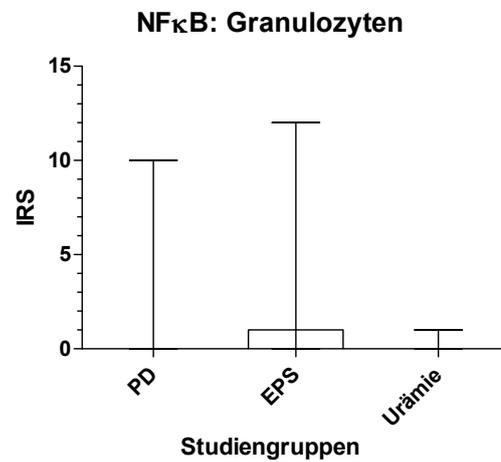
Abb. 70: Immunreaktiver Score der GefäÙe



	PD	EPS	Urämie
Minimum	3.000	4.000	2.000
25% Percentile	7.250	8.000	4.250
Median	11.00	12.00	7.000
75% Percentile	14.00	16.00	11.50
Maximum	20.00	30.00	20.00

Kruskal-Wallis test	
P value	0.0582
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

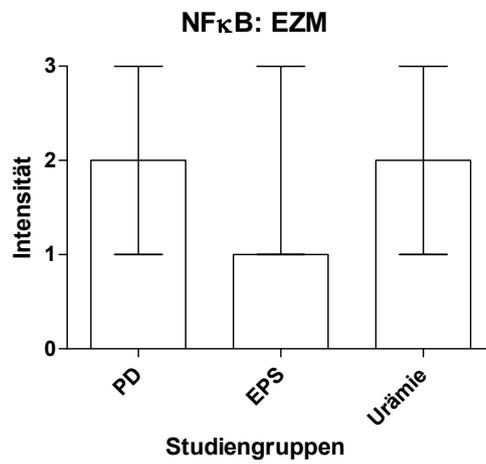
Abb. 71: Immunreaktiver Score der Rundzellen



	PD	EPS	Urämie
Minimum	0.0	0.0	0.0
25% Percentile	0.0	0.5000	0.0
Median	0.0	1.000	0.0
75% Percentile	6.500	9.000	0.5000
Maximum	10.00	12.00	1.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.1203
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

Abb. 72: Immunreaktiver Score der Granulozyten



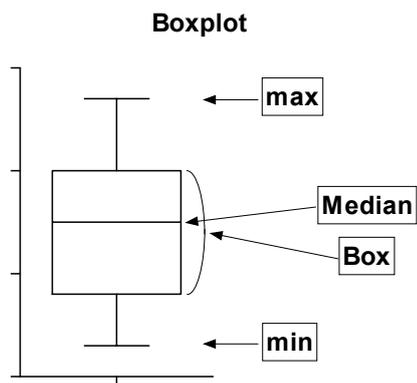
	PD	EPS	Urämie
Minimum	1.000	1.000	1.000
25% Percentile	2.000	1.000	2.000
Median	2.000	1.000	2.000
75% Percentile	2.000	3.000	3.000
Maximum	3.000	3.000	3.000

Kruskal-Wallis test	
P value	0.2228
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	No

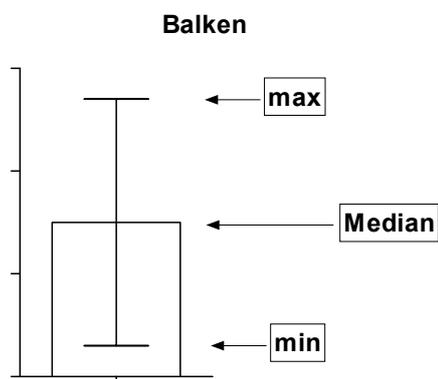
Abb. 73: Intensität der extrazellulären Matrixfärbung

### 3.5 Erläuterung zur graphischen Darstellung

Für die anschauliche Darstellung der Ergebnisse der statistischen Aufbereitung wurden zwei prinzipiell unterschiedliche Typen von Diagrammen verwendet:



Boxplots wurden verwendet, um kardinalskalierte Daten darzustellen. Die sogenannte „Box“ stellt dabei den Bereich dar, in welchem 50% aller Werte liegen, wird also durch die 25%- und 75%-Perzentilen begrenzt. Der Balken in der Box stellt den Median dar, die „Antennen“ den Maximal- bzw. Minimalwert.



Balkendiagramme wurden für die Darstellung der ordinalskalierten Daten verwendet. Die Höhe der Säule entspricht dabei dem Median, die Fehlerbalken stellen Maximal- beziehungsweise Minimalwerte dar.

Abb. 74: Verwendete Diagramme

## 4 Diskussion

### 4.1 Einführung - Stand der Forschung

Zunächst soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über den aktuellen Forschungsstand zur Pathogenese der EPS vorangestellt werden. In den weiteren Kapiteln folgt dann die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit und die Einordnung in den Gesamtkontext vorangegangener Forschungsarbeiten und bestehender Lehrmeinungen.

#### 4.1.1 Pathophysiologie der EPS

Die ersten Fallberichte über die PD-assoziierte EPS wurden bereits in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts veröffentlicht [104, 105]. Seither hat sich das Verständnis dieses komplexen Krankheitsbildes zwar verbessert, die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind allerdings bis heute nicht vollständig bekannt. Insbesondere die Abgrenzung der EPS von der einfachen Peritonealfibrose ist umstritten. Garosi et al postulieren seit geraumer Zeit, dass es sich um zwei strikt zu trennende nosologische Entitäten handelt, denen zwar ähnliche, aber unabhängige Pathomechanismen zugrunde liegen [89].

Die Tatsache, dass im Gegensatz zur einfachen Peritonealfibrose bei der EPS kein einzelner, kausaler Auslöser bekannt ist, wird als Hauptargument für diese Hypothese angeführt. Denn obwohl die EPS nach übereinstimmender Meinung stark mit der Dauer der Peritonealdialyse korreliert, ist diese weder notwendige noch hinreichende Voraussetzung für die Entstehung der EPS. Es sind sowohl idiopathische, PD-unabhängige EPS-Fälle beschrieben, als auch zahlreiche Fälle, welche bereits wenige Monate nach Beginn der Peritonealdialyse auftraten. Mehr als die Hälfte aller EPS-Fälle werden zudem erst nach Beendigung der PD diagnostiziert, auch EPS nach erfolgter Nierentransplantation wird in zunehmenden Maße beobachtet [84, 90]. Die signifikanten Unterschiede in der histologischen Morphologie werden ebenfalls als Argument genannt [89].

Im Gegensatz dazu sieht die Mehrheit der Forschungsgemeinde jedoch einen klaren Zusammenhang zwischen der PD-bedingten Fibrose und der EPS. Demnach entwickelt sich die EPS durch unbekannte Einflüsse aus der PD-Fibrose und stellt so gesehen dessen Endstadium und Vollbild dar [106]. Argumentativ basiert diese Meinung auf der Tatsache, dass der PD-bedingte Ultrafiltrationsverlust und damit einhergehend der „high transporter“-Status mit dem EPS-Risiko korreliert [107]. Als Grund für die hohe Inzidenz von EPS nach Beendigung der PD wird vermutet, dass die fehlende Eliminierung von Entzündungsmediatoren und Fibrin aus der Bauchhöhle die Entwicklung der EPS begünstigt [108].

Aufgrund der niedrigen Inzidenz der EPS gilt ein multifaktorielles Krankheitsmodell als wahrscheinlich, wobei die PD-bedingte Fibrose als erster, prädisponierender Schritt angesehen wird. Wesentlich für die Ausbildung des Vollbildes der EPS gilt folglich ein zweiter, noch nicht vollständig verstandener Schritt. Dieses pathophysiologische Erklärungsmodell ist als „two hit“-Hypothese bekannt [92].

Wie aus Abbildung 75 ersichtlich ist der „first hit“ die Peritonealdialyse selbst. Bioinkompatible PD-Lösungen und Urämie führen dieser Hypothese zufolge zur Schädigung der peritonealen Membran mit nachfolgender Exsudation von Fibrin, Ausbildung von Vaskulopathie, Fibrosierung sowie zur bereits vorgestellten Epithel-Mesenchym-Transition (EMT).

Für den Progress von der einfachen, potentiell reversiblen Fibrose hin zur EPS ist nun ein „second hit“ obligatorisch. Verschiedene Risikofaktoren für diesen zweiten Schritt wurden iden-

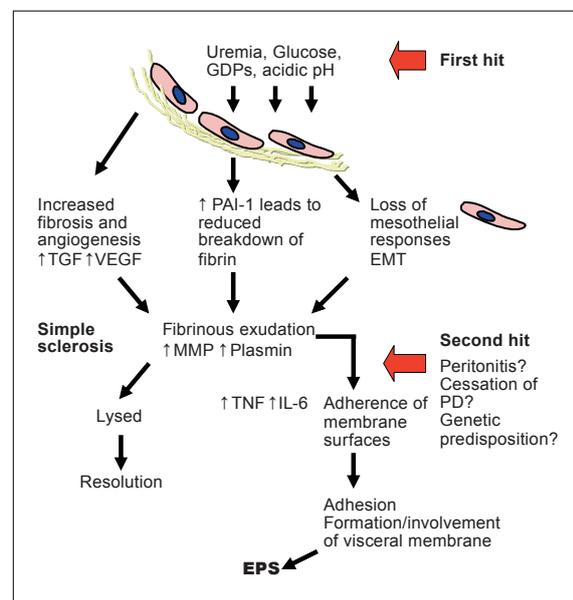


Abb. 75: Die „two hit“-Hypothese.

Nach Augustine et al, 2011

tifiziert, wobei die Dauer der Peritonealdialyse allgemein als wichtigster Faktor angesehen wird (siehe Abb. 76) [92].

### Mögliche Risikofaktoren für die Entstehung der EPS

PD-Dauer

Bioinkompatible Dialysate (hohe Glucose, niedriger pH, osmotischer Stress, Icodextrin)

Rezidivierende infektiöse Peritonitiden (v.a. staph. aureus)

Ultrafiltrationsverlust

Beendigung der Peritonealdialyse

Nierentransplantation sowie profibrotische Dauermedikation

Niedriges Alter

Genetische Prädisposition

Medikamente (Betablocker)

Rauchen

---

Abb. 76: Risikofaktoren für die EPS [108, 109]

Der „second hit“ führt zu weiterer Aktivierung von Fibroblasten, Fibrin-Ablagerungen sowie zur vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie VEGF, TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$ . Diese komplexen Mechanismen auf zellulärer Ebene führen zu zunehmender Fibrosierung, Angiogenese und Einwanderung von Entzündungszellen. Die pathologischen Prozesse greifen auf das viszerale Peritoneum über, wobei die sklerotisch verdickte Membran zunehmend Teile des Intestinums kokonartig einmauert. Kommt es durch diese Vorgänge zur Obstruktion von Darmschlingen bis hin zur Ileus-Symptomatik, ist letztlich das Vollbild der EPS erreicht [92].

#### 4.1.2 Die Rolle des RAAS bei der Pathogenese der Peritonealfibrose und der EPS - bisherige Erkenntnisse

Wie bereits weiter oben dargelegt, besitzt das RAAS profibrotische, proinflammatorische und neoangiogenetische Wirkungen im Sinne eines parakrinen Gewebehormons in verschiedenen Organen [110, 111, 112]. Die pathogenetische Rolle dieses Hormonsystems bei peritonealen Fibroseprozessen ist bislang jedoch nicht gänzlich aufgeklärt. Der folgende Abschnitt soll diesbezüglich den aktuellen Wissensstand zusammengefasst wiedergeben.

Wie Imai et al im Jahr 2001 zeigten, spielt das RAAS eine wichtige physiologische Rolle bei der Regulation des Wassertransportes im Peritoneum [113]. Im Rahmen lange andauernder Peritonealdialyse wird dem RAAS, insbesondere dessen Effektmolekül AT II, eine tragende Rolle bei der Entwicklung der Fibrosierung des Peritoneums und des Ultrafiltrationsversagens zugeschrieben [114].

Noh et al konnten nachweisen, dass menschliche Mesothelzellkulturen konstitutiv AGT, ACE sowie die Angiotensin II-Rezeptoren AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R exprimieren. Sie zeigten außerdem, dass hohe Glucosekonzentration die Expression dieser Gene steigern kann und Angiotensin II eine wesentliche Rolle bei der bereits angesprochenen Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) spielt [115]. Unphysiologische, saure PDF gelten ebenso als wichtiger Stimulus für die RAAS-Aktivierung im Peritoneum [116]. Schließlich sind auch infektiöse Peritonitis-Episoden in der Lage, die Angiotensin II-Expression in Mesothelzellkulturen zu erhöhen [117].

Der Mechanismus, über welchen das RAAS an der Entstehung der Peritonealfibrose beteiligt ist, ist nicht vollständig verstanden. Weitgehend gesichert ist die Tatsache, dass AT II sowohl TGF- $\beta$ 1 als auch VEGF induzieren kann [115, 118]. Diesen beiden Zytokinen wird eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der peritonealen Fibrose und Hypervaskularisation mit konsekutivem Ultrafiltrationsversagen bei der PD zugeschrieben [114].

In mehreren *in vitro*-Studien wurde der Effekt einer Blockade des RAAS auf die peritoneale Fibrosierung untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Losartan und Captopril die Glucose-induzierte TGF- $\beta$ 1-Synthese reduzieren können [115]. In einer anderen Studie von Sauter et al wurde festgestellt, dass ACE-Inhibitoren (ACEI) und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker (ARB) die überschießende VEGF-Produktion in Mesothelzellkulturen abschwächen können [119].

Verschiedene *in vivo*-Studien an Tiermodellen weisen auf einen Benefit der therapeutischen beziehungsweise prophylaktischen RAAS-Blockade hin. Duman et al wiesen beispielsweise einen antifibrotischen Effekt des ACE-Inhibitors Enalapril in einem Ratten-Tiermodell nach [120]. Auch Studien zur Wirkung von Spironolacton und Aliskiren als Aldosteron- respektive Renin-Antagonisten zeigten protektive Effekte hinsichtlich der Entstehung der Peritonealfibrose bei Ratten [121, 122].

Daten zur Wirksamkeit einer RAAS-Blockade bei PD-Patienten sind weitaus spärlicher. In einer retrospektiven Studie mit 217 Langzeit-PD-Patienten zeigten Kolesnyk et al, dass die Gabe von ACEI und ARB die Entwicklung eines „high transporter“-Status vermindern kann [123]. Fang et al konnten zudem einen signifikanten Überlebensvorteil von PD-Patienten nachweisen, welche mit ACEI und ARB behandelt waren [124]. Auch Jing et al fanden in einer retrospektiven Analyse, dass ACEI und ARB den peritonealen Stoffaustausch günstig beeinflussen können [125].

Trotz dieser vielversprechenden Erkenntnisse fehlen weiterhin randomisierte Therapiestudien, um die Wirksamkeit einer RAAS-Blockade bei PD-Patienten evident zu sichern. Auch fehlen bislang grundlegende Daten zur Expression der verschiedenen RAAS-Komponenten im menschlichen Peritoneum, um diese als „target“ für etwaige Therapiestudien zu identifizieren.

## 4.2 Diskussion der histopathologischen Ergebnisse

Sämtliche untersuchten Moleküle konnten in dieser Studie in unterschiedlichen Zellarten und -kompartimenten im Probenmaterial gefunden werden. Damit ist der immunhistochemische Nachweis eines Großteils der wesentlichen Bestandteile des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im menschlichen Peritoneum gelungen. Die Anwesenheit der wichtigsten Komponenten des RAAS ist auch hinsichtlich eines eventuellen Einsatzes pharmakologischer Substanzen zur Therapie peritonealer Fibroseprozesse von Interesse.

Der Vitamin D-Rezeptor sowie TGF- $\beta$ 1 und NF $\kappa$ B wurden in dieser Arbeit ubiquitär aufgefunden. Auch diese Moleküle stellen aufgrund ihrer bereits dargelegten Bedeutung bei der Peritonealfibrose und ihrer Interaktion mit dem RAAS interessante Angriffspunkte bei der Suche nach neuen Therapiestrategien für die EPS dar.

Die Diskussion der Ergebnisse für die einzelnen untersuchten Makromoleküle sowie die Bewertung dieser Ergebnisse hinsichtlich deren Bedeutung bei der Pathogenese peritonealer Fibrosierung folgt in den kommenden Abschnitten.

### 4.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient in erster Linie zur histopathologischen Standarddiagnostik und ist eine der am häufigsten verwendeten histologischen Färbungen. In der EPS-Diagnostik spielt die Histopathologie eine wichtige Rolle, auch wenn sie keine definitive Diagnosestellung zulässt. Honda et al veröffentlichten 2005 eine Studie über die histologischen Charakteristika der peritonealen Fibrose in verschiedenen Stadien. Sie fanden heraus, dass im EPS-Peritoneum signifikant häufiger Fibrin-Ablagerungen, Fibroblasten-Schwellung, kapilläre Neoangiogenese und Rundzellinfiltrate auftraten [94].

Problematisch hinsichtlich einer einheitlichen, verlässlichen EPS-Diagnostik mittels Histopathologie ist die fehlende Standardisierung der Entnahme- und Untersuchungstechnik sowie die bislang fehlende Differenzierung zwischen einfacher, PD-bedingter Fibrose und EPS. Braun et al konnten spezifische Unterschiede in der Präsentation von PD-Fibrose und EPS aufzeigen, insbesondere bei der Häufigkeit von Fibroblasten-artigen Zellen (FLC), mesothelialer Denudation, verminderter Zellularität, Fibrinablagerungen und Eisenablagerungen [95].

In der histologischen Auswertung der HE-Färbungen für diese Studie konnten diese Beobachtungen zum Teil reproduziert werden. So zeigten sich bei der mesothelialen Denudation, den Fibrinablagerungen und den Eisenablagerungen jeweils bei der EPS die höchsten Werte. Zusätzlich fanden sich erhöhter Gefäßreichtum, vermehrte Fibroblasten-Foci sowie Rundzellinfiltrate und Einblutungen in der EPS-Gruppe. Insgesamt zeigte sich ein erwartungsgemäßes pathologisches Korrelat der jeweiligen Diagnosegruppe.

#### 4.2.2 Renin

Renin ist eine Endopeptidase und katalysiert die Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I (AT I). Es steht ganz am Anfang der Reaktionskaskade des RAAS und besitzt somit eine Schlüsselfunktion in diesem hormonellen Regelkreis. In dieser Funktion stellt es eine der wichtigsten Stellschrauben in der Regulation des Systems dar [1].

Als „Schrittmacher“ des RAAS ist Renin folglich von großem therapeutischem Interesse. Seit wenigen Jahren steht, nach langjähriger, intensiver Forschung, mit dem Aliskiren nun erstmals ein zugelassener, direkter Renin-Inhibitor für die Therapie der essentiellen arteriellen Hypertonie zur Verfügung [126].

In dieser Studie wurde festgestellt, dass Renin zwar schwach, aber zuverlässig in Mesothelien sowie Endothelien des Peritoneums nachweisbar ist. Auch Mastzellen zeigten eine schwach positive Färbung nach Antikörpermarkierung. Die immunhistochemische Methodik erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob lokales Renin *in situ* exprimiert wird oder durch Aufnahme aus dem Blutkreislauf in die Zelle gelangt. Studien hierzu gelangten über mRNA-Nachweis zu inkonsistenten Ergebnissen, sodass letztere Variante nicht außer Acht gelassen werden sollte [127, 128].

Im Vergleich der Studiengruppen konnte keine signifikante Abweichung der Renin-IRS festgestellt werden. Es ergab sich demnach kein Hinweis darauf, dass Renin im Rahmen der Peritonealfibrose und der EPS hoch- oder herunterreguliert wird. Dennoch bleibt festzuhalten, dass Renin lokal im Peritoneum vorhanden ist und somit ein Zielmolekül für eine Beeinflussung der RAAS-Aktivität bei peritonealen Fibroseprozessen darstellen könnte. Auch zirkulierendes, systemisches Renin könnte durchaus eine lokale Wirkung besitzen, vor allem auf das peritoneale Angiotensinogen (s.u.).

Nachdem es lange Zeit als rein katalytisch wirksames Enzym angesehen wurde, sorgte die Entdeckung des Renin-Rezeptors für ein neu erwachtes Interesse an

den Wirkungen des Renins [129]. Huang et al zeigten, dass Renin in der Lage ist, das profibrotische Zytokin TGF- $\beta$ 1 in Mesangiumzellen zu induzieren, und zwar unabhängig von AT II [130].

Transgene Mäuse mit Überexpression des Renin-Rezeptors zeigten eine AT II-unabhängige, progressive Glomerulosklerose, wie Kaneshiro et al demonstrierten [131]. Clavreul et al fanden zudem heraus, dass Renin, beziehungsweise dessen Präkursor Prorenin, oxidativen Stress und profibrotische Wachstumsfaktoren über den (Pro-)Renin-Rezeptor in der Zellkultur induzieren kann [132].

In der Zusammenschau dieser bisherigen Erkenntnisse erscheint eine Blockade des Renins im Rahmen der peritonealen Fibrose und der EPS aussichtsreich. Aliskiren, der einzige bislang zugelassene Renin-Inhibitor, ist in der Lage, dessen enzymatische Aktivität zu unterbinden und damit die „downstream“-Effektoren des RAAS zu antagonisieren. Batenburg et al fanden aber heraus, dass der Wirkstoff die Bindung von Renin an dessen Rezeptor nicht effektiv blockieren kann und die Halbwertszeit des Renins um das zwei- bis Dreifache verlängert [133]. Da ein spezifischer Renin-Rezeptorblocker bislang nicht bekannt ist, ist das Potential von Renin als „target“ für eine Therapie bei fibrotischen Erkrankungen zum jetzigen Zeitpunkt daher limitiert.

### 4.2.3 Angiotensinogen

Angiotensinogen ist das Ausgangssubstrat des RAAS. Es handelt sich um ein Protein, welches aus 452 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Renin katalysiert die Abspaltung der zehn n-terminalen Aminosäuren des AGT, das Dekapeptid Angiotensin I (AT I), womit AGT als Präkursor von AT I angesehen werden kann. Hauptort der AGT-Synthese sind die Hepatozyten der Leber [134].

Nach Auswertung der Färbeergebnisse wurde festgestellt, dass AGT in Mesothelien, Endothelien, Mastzellen sowie Granulozyten des Peritoneums immunhistochemisch nachweisbar ist. Da AGT wie auch das Renin ein systemisch zirkulierendes Plasmaprotein ist, muss auch hier die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass das nachgewiesene AGT nicht lokal exprimiert wird sondern durch Aufnahme aus dem Blutkreislauf in die Zelle gelangt [135, 127].

Im Vergleich zwischen den drei Studiengruppen zeigte sich nach statistischer Auswertung, dass Gefäße im EPS-Peritoneum im Vergleich zur PD- und zur Urämie-Gruppe signifikant respektive hoch signifikant niedrigere AGT-IRS aufwiesen. Als Erklärung für diese unerwartete Beobachtung könnte sowohl eine Downregulation als auch, aus Sicht des Autors die schlüssigere Alternative, ein erhöhter Verbrauch des lokalen AGT bei der EPS in Frage kommen.

Es ist denkbar, dass aus der postulierten Beteiligung des RAAS an peritonealen Fibroseprozessen im Rahmen der EPS ein gesteigerter Umsatz von lokalem AGT resultiert. Die Reaktionskaskade des Hormonsystems könnte dabei durch Zurückgreifen auf systemisch zirkulierendes AGT aufrechterhalten werden. Der erhöhte Verbrauch des lokalen AGT durch die hypothetische Überaktivität des RAAS würde somit mehr als ausgeglichen. Dieser Erklärungsansatz bleibt freilich spekulativ und müsste durch eingehendere Forschungsarbeit verifiziert werden.

### 4.2.4 Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1)

Das Angiotensin Converting Enzyme 1 (ACE 1) setzt Angiotensin I in Angiotensin II um, dem wichtigsten Effektor des RAAS. Es stellt somit ein weiteres Schlüsselmolekül des Hormonsystems dar. Hauptwirkungsort von ACE 1 sind vor allem die lumenseitigen Endothelienoberflächen von Niere und Lunge, es wird allerdings weitgehend ubiquitär endothelial exprimiert [3].

Durch immunhistochemische Untersuchung wurde in dieser Studie festgestellt, dass ACE 1 in Endothelien des Peritoneums exprimiert wird. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für die Beurteilung der Rolle des RAAS auf Gewebeebene im Peritoneum. Durch die Anwesenheit von ACE 1 kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass Angiotensin II im Peritoneum gebildet wird und dort lokale Wirkungen im Sinne eines Gewebehormons besitzt.

Im Vergleich zwischen den Studiengruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der ACE 1 Expression festgestellt werden. Tendenziell scheint das ACE 1 jedoch in Gefäßen von EPS-Patienten erhöht zu sein. Möglicherweise war der Stichprobenumfang zu gering, um hier eine Signifikanz zu zeigen, der p-Wert lag bei 0,12. Eine, wenngleich auch geringe, Erhöhung des ACE 1 in EPS könnte auf eine erhöhte Aktivität dieses RAAS-Pathways bei der EPS hindeuten. Ähnliche Beobachtungen konnten bei diabetischer Nephropathie, Atherosklerose und Leberfibrose gemacht werden [136, 137, 138]. Die profibrotischen und proinflammatorischen Eigenschaften von AT II, dem Reaktionsprodukt von ACE 1, wurden durch mehrere Studien gezeigt [110, 139, 111, 140]. Eine ähnliche Rolle des ACE 1 beziehungsweise AT II für die Pathogenese der EPS kann hier nur vermutet werden, eine Wiederholung der Untersuchung mit höherer statistischer Power könnte diese Mutmaßung möglicherweise erhärten.

Es lässt sich durch die Erkenntnisse dieser Arbeit jedoch festhalten, dass der therapeutische Einsatz von ACE Inhibitoren bei fibrotischen Prozessen im Peritoneum auf molekularer Ebene, hinsichtlich der Anwesenheit des „targets“, schlüssig ist.

#### 4.2.5 Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2)

Das Angiotensin Converting Enzyme 2 ist ein lange Zeit unbekannt gebliebener Teilnehmer in der komplexen Reaktionskaskade des RAAS. Es gilt in mancherlei Hinsicht als „Gegenspieler“ des ACE 1. Es katalysiert die Abspaltung einer n-terminalen Aminosäure von AT II (zu Ang 1-7) sowie von AT I (zu Ang 1-9), letzteres jedoch mit weitaus geringerer Affinität. Somit sorgt es für den „Abbau“ sowohl des Haupteffektormoleküls des RAAS, als auch dessen Vorläufermoleküls und Hauptsubstrates des ACE 1. Ang 1-7 besitzt zudem rezeptorvermittelte Effekte, welche die klassischen Wirkungen des RAAS zusätzlich zu antagonisieren scheinen. So soll es blutdrucksenkende Eigenschaften besitzen, aber interessanterweise auch antifibrotisch und antiinflammatorisch wirksam sein [11, 13, 141, 142].

Die Auswertung der immunreaktiven Scores zeigte, dass Blutgefäße in Peritonea von EPS-Patienten signifikant niedrigere Werte erzielten als die der anderen Studiengruppen. Diese Beobachtung ist unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Eigenschaften des ACE 2-vermittelten Pathways von besonderem Interesse. Eine Downregulation von ACE 2 bei Patienten mit EPS könnte einen wesentlichen Beitrag bei der Pathogenese der Erkrankung spielen. Durch die herabregulierte antagonistische Seite des Hormonsystems wäre ein Überwiegen des als profibrotisch angesehenen Signalweges über die ACE 1-/AT II-/AT<sub>1</sub>R-Achse denkbar. Auch der EMT-bedingte Verlust von ACE 2-, nicht jedoch ACE 1-exprimierenden Mesothelzellen im Verlauf der EPS könnte zu diesem Übergewicht des profibrotischen und vasokonstriktorisches Pathways im Peritoneum beitragen.

Für verschiedene Nierenerkrankungen sind ähnliche Beobachtungen beschrieben worden. So fanden Mizuiri et al eine verminderte Expression von ACE 2 in Patienten mit diabetischer Nephropathie, während die ACE 1-Expression erhöht war [136]. In einer weiteren Studie stellten sie ähnliche Ergebnisse bei der IgA-Nephropathie in Ratten fest [143]. Velkosa et al konnten zeigen, dass ACE-Inhibitoren die Aktivität von ACE 2 bei akutem Nierenversagen in Ratten erhöhen

und dieser Effekt zur positiven Wirkung dieser Substanzgruppe beitragen könnte [144]. Oudit et al demonstrierten in einer Studie, dass eine Therapie mit rekombinatem, systemisch verabreichtem ACE 2 die diabetische Nephropathie im Mausmodell abmildert und blutdrucksenkend wirkt [145].

Auch bei Fibrose in anderen Organen sind vergleichbare Erkenntnisse gewonnen worden. So fanden Li et al, dass ACE 2 in Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose stark herunterreguliert und dessen Aktivität vermindert war. Systemische Gabe von rekombinatem ACE 2 im Tiermodell reduzierte zudem die Ablagerung von Kollagen in der Lunge. Das Stummschalten des ACE 2-Gens hingegen verstärkte die Fibrosierung des Lungengewebes und erhöhte außerdem signifikant die pulmonale AT II-Konzentration [146]. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation konnten Chen et al außerdem zeigen, dass vorab gegebenes Ang 1-7 die Fibrosierung im Rahmen einer akuten Lungenschädigung bei Mäusen abschwächt, und dass dieser Effekt über den Mas-Rezeptor vermittelt wird [147].

Pan et al zeigten, dass ACE 2 auch bei kardialer Fibrose im Rahmen von chronischem Vorhofflimmern im Tiermodell herunterreguliert ist [148]. Sie formulierten außerdem drei mögliche Mechanismen, über welche ACE 2 die kardiale Fibrose verhindern könne. Dies sei zum Ersten, dass ACE 2 das AT II zu Ang 1-7 abbaut und somit den wesentlichen Stimulus der Fibrose unschädlich macht. Ein weiterer Mechanismus sei demzufolge die Eigenschaft von Ang 1-7, die Expression des AT<sub>1</sub>-Rezeptors zu vermindern, wie Clark et al herausfanden [149]. Die dritte Möglichkeit sei schließlich die vasodilatative Wirkung von Ang 1-7, welche nach Heitsch et al über Stickstoffmonoxidfreisetzung vermittelt werde [150].

Zusammenfassend ist der ACE 2-/Ang 1-7-/Mas-Signalweg als natürlicher Antagonist des herkömmlichen RAAS von großem therapeutischen Interesse. Die Ergebnisse dieser Studie könnten auf eine mögliche Beteiligung dieses Signalweges bei der Pathogenese der enkapsulierenden Peritonealsklerose hinweisen. Aufgrund bestehender Forschungsergebnisse hinsichtlich der vorteilhaften Effekte

von Ang 1-7 ließe sich hieraus ein möglicher therapeutischer Ansatz entwickeln, welcher in weiterführenden Arbeiten eingehender untersucht werden sollte.

### 4.2.6 Aldosteron-Rezeptor

Aldosteron ist ein dem Angiotensin nachgeschaltetes, steroidales Hormon und ein wichtiges Effektormolekül des RAAS. Es vermittelt seine Wirkungen dabei über einen intrazellulären Rezeptor, welcher nach Bindung des Aldosterons als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene reguliert. Die Wirkungen dieses Hormons umfassen in Niere und Kolon eine gesteigerte Kaliumausscheidung, eine vermehrte Retention von Natrium und damit auch ein Anstieg des extrazellulären Volumens und des Blutdrucks. Darüber hinaus spielt Aldosteron auch eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener Zellfunktionen. So ist bekannt, dass es im Rahmen von Fibroseprozessen beispielsweise in Herz, Gefäßen und Niere beteiligt ist [151, 152, 153].

Aufgrund dieser bekannten Eigenschaften wurde die Expression des Aldosteron-Rezeptors (auch Mineralocorticoid-Rezeptor genannt, MCR) in den Peritonealgewebe der Studienpatienten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sämtliche untersuchten Zellarten eine zytoplasmatische Expression des Aldosteron-Rezeptors aufwiesen. Insbesondere Mesothelien, Endothelien und Rundzellen zeigten eine starke Anfärbung.

In der statistischen Auswertung der Färbeergebnisse konnte festgestellt werden, dass Blutgefäße von EPS-Patienten signifikant niedrigere IRS erzielten. Dies bestätigte sich in hoch signifikantem Maße auch im Post-Test beim Vergleich zwischen EPS- und Urämie-Gruppe. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass der verwendete Antikörper laut Produktinformation seinerseits in der Aldosteron-Bindestelle des Rezeptors bindet und diese damit blockiert. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass der Antikörper aktive Rezeptor-Aldosteron-Komplexe nicht binden kann und diese somit auch nicht angefärbt werden. Es werden ergo nur inaktive, zytoplasmatisch vorliegende Rezeptoren detektiert. Die geringere Anfärbung der Gefäße im EPS-Peritoneum könnte somit ein Hinweis auf eine vermehrte Aktivität des Aldosterons im Gewebe hindeuten, was eine geringere Konzentration an freien, inaktiven Rezeptoren zur Folge hätte.

Wie Esroy et al in einer *in vivo*-Studie an Ratten feststellten, kann eine Behandlung mit Spironolacton, einem gängigen Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten, die peritoneale Fibrosierung im Rahmen infektiöser Peritonitiden abmildern [121]. Nishimura et al demonstrierten zudem, dass Spironolacton TGF- $\beta$ 1 in Ratten mit Peritonealfibrose supprimiert [154]. Okazaki et al zeigten, dass Aldosteron *in vitro* einen profibrotischen Stimulus direkt auf die Mesothelien des Peritoneums ausübt [155], die gleiche Arbeitsgruppe stellte außerdem eine profibrotische Wirkung von Aldosteron auf Fibroblasten in Ratten-Peritonea fest [156].

Vor diesem Hintergrund ließe sich durch die Erkenntnisse dieser Arbeit eine Hemmung des MCR mittels Aldosteronantagonisten im Rahmen der peritonealen Fibrose und der EPS als Therapieversuch durchaus rechtfertigen. Entsprechende randomisierte Therapiestudien zur Evidenzsicherung existieren bislang jedoch nicht.

### 4.2.7 Vitamin D-Rezeptor

Vitamin D ist ein steroidales Hormon, welches seine Wirkungen zum überwiegenden Teil über einen spezifischen Rezeptor vermittelt, dem Vitamin D-Rezeptor (VDR). Dieser ist, wie auch der Aldosteron-Rezeptor, ein intrazellulär vorliegender, nach Bindung des Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor. Dieser reguliert nach Einwanderung in den Zellkern die Expression verschiedener Gene. Auch sogenannte „rapid responses“, also schnelle, nicht-genomische Effekte des Vitamin D scheinen auf die Anwesenheit des VDR angewiesen zu sein [157].

Die immunhistochemische Untersuchung des VDR im untersuchten Probenmaterial ergab, dass dieser Rezeptor in nahezu hundert Prozent der Zellen exprimiert wird. Dieses ubiquitäre Vorkommen des VDR entspricht auch bisherigen Erkenntnissen in der Fachliteratur [157, 158]. Die Färbung zeigte durchweg hohe immunreaktive Scores in allen Zellarten. Die Varianz zwischen den Studiengruppen war dabei sehr gering. Fibrozyten und Granulozyten in der Urämie-Gruppe zeigten signifikant niedrigere IRS im Vergleich zur EPS-Gruppe. Die übrigen Ergebnisse zeigten keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen den drei Gruppen.

Die RAAS-limitierenden sowie insgesamt anti-inflammatorischen Wirkungen des Vitamin D stellen einen interessanten Ansatz zur Beeinflussung der Pathogenese der EPS dar. Die festgestellte, ubiquitäre Expression des Vitamin D-Rezeptors im Peritoneum könnte dabei ein wesentliches „target“ für eine eventuelle Therapie der EPS darstellen.

1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> hemmt die Renin-Expression direkt an der Promotorregion des Renin-Genes [159]. Kong et al demonstrierten zudem, dass eine Überexpression des Vitamin D-Rezeptors im Mausmodell die Expression von Renin in juxtaglomerulären Zellen der Niere reduziert, während ein Vitamin D-„knock-out“ zu Hyperreninämie führt [19]. In einer Studie an 184 normotensiven Probanden konnten Forman et al zeigen, dass erniedrigte 25(OH)-Vitamin D<sub>3</sub> Spiegel mit einer erhöhten RAAS-Aktivität assoziiert sind [160].

Ebenfalls interessant ist die von Yanagisawa et al aufgedeckte Interaktion des Vitamin D- und des TGF- $\beta$ 1-Signalwegs über das Smad3-Protein [161]. Aschenbrenner et al zeigten daraufhin, dass 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$  die Smad3-Konzentration in Nierengewebe von Mäusen reduziert und somit die profibrotischen Wirkungen von TGF- $\beta$ 1 reduzieren könnte [162]. In einer *in vitro*-Studie an Rattenmesothelzellen stellten Yang et al kürzlich fest, dass 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$  die durch hohe Glukosekonzentration und bakterielle Lipopolysaccharide induzierte TGF- $\beta$ 1-Expression verhindern kann [163].

Eine weitere relevante Interaktion des Vitamin D-Systems ist seine direkte Wechselwirkung mit dem wichtigen Entzündungsmediator NF $\kappa$ B. Szeto et al demonstrierten, dass VDR-negative Fibroblasten in Knock-Out-Mäusen eine erhöhte Aktivität von NF $\kappa$ B durch verminderte I $\kappa$ B $\alpha$ -Konzentrationen zeigten [164]. Die selbe Arbeitsgruppe stellte zudem fest, dass hohe Glukose-Konzentrationen eine NF $\kappa$ B-vermittelte AGT-Expression in Mesangiumzellen induziert, und dass dieser Effekt durch 1,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$  abgemildert wird [165].

*In conclusio* ließe sich somit die Progression der peritonealen Fibrose möglicherweise durch Ausgleich eines Vitamin D-Mangels beziehungsweise durch Vitamin D-Analoga vermindern. Zum Einen auf direktem Wege über eine Hemmung der RAAS-Aktivität durch verminderte Renin-Expression, zum Anderen aber auch über die Interaktion mit den wichtigen „downstream“-Mediatoren TGF- $\beta$ 1 und NF $\kappa$ B.

### 4.2.8 TGF-β1

Der „Transforming-Growth-Factor β1“ (TGF-β1) ist ein Zytokin, welches zahlreiche Wirkungen auf verschiedene Zellfunktionen hat, unter anderem auch Zellproliferation und die Stimulation von Fibrosierung und Vernarbung [68].

Der TGF-β1-Pathway wird seit einiger Zeit intensiv beforscht und zeichnet sich durch seine hohe Komplexität und teilweise gegensätzlichen Wirkungen aus. Vermittelt wird das TGF-β-Signal über einen membranständigen Rezeptor und nachfolgend über die sogenannten SMAD-Proteine, welche dann als Transkriptionsfaktoren im

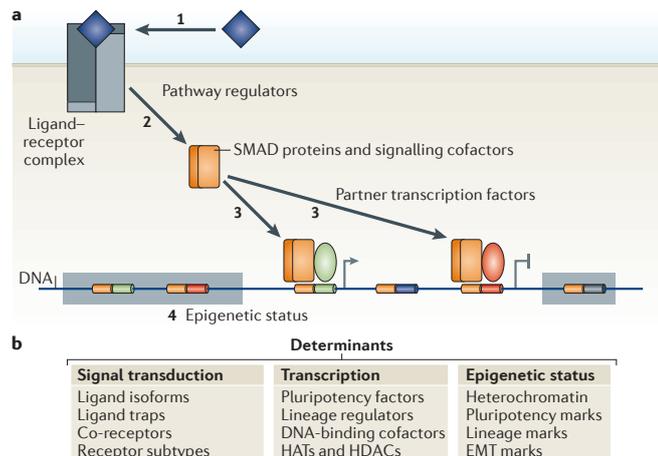


Abb. 77: Der TGF-β1-Signalweg. Nach Massagué, 2012

Zellkern fungieren (siehe Abb. 77). Die Antwort auf das TGF-β1-Signal variiert je nach Zelltypus und je nach aktuellem Zustand der Zelle zum Teil jedoch erheblich [166].

Als gesichert gilt die wesentliche Beteiligung von TGF-β1 bei der „Epithel-Mesenchym-Transition“ (EMT) während der Embryogenese, aber auch im Rahmen pathologischer Prozesse wie dem Mamma-Karzinom oder der renalen Fibrose [167, 168].

Wie oben bereits ausgeführt, wird der EMT auch eine tragende Rolle bei Entstehung der veränderten Transportereigenschaften sowie bei der Pathogenese der peritonealen Fibrosierung zugeschrieben, wobei TGF-β1 nachweislich eine EMT in menschlichen Mesothelzellkulturen triggern kann [65]. Kang et al wiesen zudem nach, dass glucosebasierte PDF bei der Peritonealdialyse die Expression von TGF-β1 steigern [169].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von TGF- $\beta$ 1 im Peritoneum der Studienpatienten untersucht. Es konnte eine ubiquitäre Anfärbung aller untersuchten Zellarten beobachtet werden, darunter auch Mesothelien, Endothelien und Fibroblasten. Die statistische Auswertung zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede der immunreaktiven Scores zwischen den einzelnen Studiengruppen. Demnach konnte kein Unterschied in der TGF- $\beta$ 1-Expression in den verschiedenen Manifestationen der peritonealen Fibrose festgestellt werden, auch wenn die IRS in PD- und EPS-Patienten tendenziell höher lagen.

Dies stellt einen vermeintlichen Widerspruch zur erwarteten Hochregulation des TGF- $\beta$ 1 im Laufe der Progression von der einfachen, urämiebedingten Fibrose hin zur EPS dar. Möglicherweise lässt sich dieser Widerspruch dahingehend auflösen, dass Urämie *per se* ebenso wie die PD-bedingte Bildung von AGE bereits in Frühstadien eine TGF- $\beta$ 1-Expression induzieren könnten [170]. Die Progression von der Peritonealfibrose zur EPS im Sinne der „two hit“-Hypothese müsste dieser Überlegung nach über einen anderen Mechanismus als eine verstärkte TGF- $\beta$ 1-Expression erfolgen, beispielsweise etwa über epigenetische Faktoren. Hinsichtlich der oben beschriebenen, äußerst komplexen Regulation der TGF- $\beta$ 1-Wirkungen erscheint diese Möglichkeit nicht unrealistisch.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des TGF- $\beta$ 1-Signalweges die EMT aufhalten oder gar rückgängig machen kann. Serie et al veröffentlichten im Jahr 2012, dass ein „Stummschalten“ des TGF- $\beta$ 1-Gens mittels Pyrrol-Imidazol Polyamiden in einem EPS-Rattenmodell den Fibroseprozess günstig beeinflussen kann und schlagen diese Substanzgruppe als mögliches Therapeutikum vor [171]. Loureiro et al zeigten zudem, dass Tamoxifen eine durch TGF- $\beta$ 1 ausgelöste EMT in Mesothelzellen von PD-Patienten aufhalten kann und somit die Schädigung der peritonealen Membran reduziert [172].

Interessant ist hinsichtlich der bereits erläuterten Interaktion des TGF- $\beta$ 1-Signalweges mit dem RAAS außerdem eine Publikation von Kyuden et al, wonach ACE-Inhibitoren und Angiotensin II-Rezeptorblocker die durch Glucose bedingte

erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression in Mesothelzell-Kulturen ebenfalls vermindert [173]. Es gibt somit gute Argumente dafür, TGF- $\beta$ 1 als wesentlichen Faktor in der Pathogenese der EPS und daher als mögliches therapeutisches „target“ zu betrachten.

#### 4.2.9 NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B ist ein bedeutender Mediator für chronische Entzündungsprozesse im menschlichen Körper. Es ist wesentlich beteiligt an der Pathogenese einer Reihe von Krankheiten mit großer volkswirtschaftlicher Bedeutung, wie dem Asthma bronchiale, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der Atherosklerose [72]. Es wurde 1986 erstmals in B-Zellen identifiziert, wo es die Expression der kappa-Leichtketten von Immunglobulinen reguliert [174]. Seither wurde seine Bedeutung bei verschiedensten inflammatorischen Prozessen weiter aufgeklärt.

Aktiviertes NF $\kappa$ B ist ein Proteinkomplex, welcher aus zumeist zwei Untereinheiten aufgebaut ist (siehe Abb. 78). Dies sind die Proteine p50 und p65 (auch relA genannt), unter Umständen kommen andere Untereinheiten wie rel, relB, v-rel und p52 hinzu. In inaktivem Zustand liegt NF $\kappa$ B im Zytoplasma an die Proteine I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  gebunden vor, die dessen Eintritt in den Zellkern verhindern. Bei Aktivierung phosphorylieren spezifische Kinasen I $\kappa$ B, welches daraufhin in Proteasomen abgebaut wird und den Eintritt von NF $\kappa$ B in den Zellkern ermöglicht. Hier bindet NF $\kappa$ B an spezifische DNA-Sequenzen und reguliert damit die Expression verschiedener Gene. Zur Beendigung der Genexpression wandert wiederum I $\kappa$ B $\alpha$  in den Zellkern, bindet das NF $\kappa$ B und transportiert es ins Zytoplasma zurück [73].

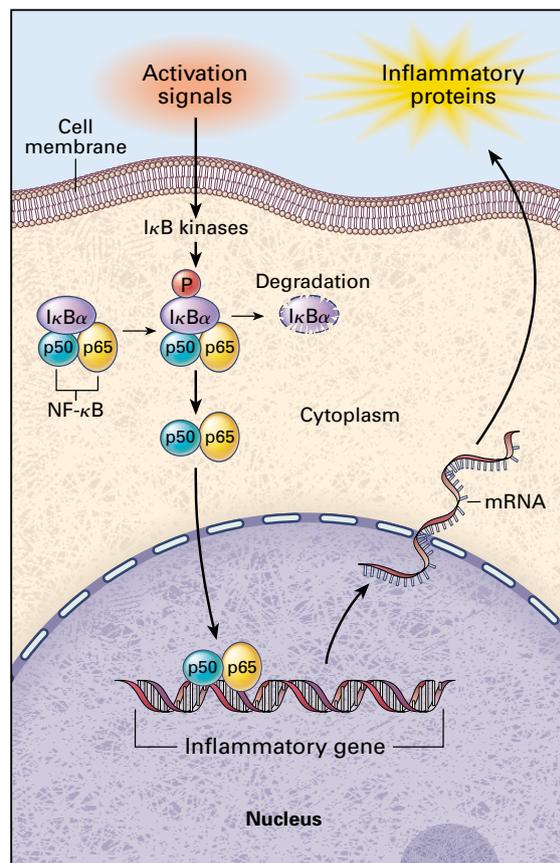


Abb. 78: NF- $\kappa$ B-Signalweg.

Nach Barnes & Karin, 1997

NF $\kappa$ B reguliert die Expression einer großen Anzahl von Genen, die für inflammatorisch und immunologisch wirksame Proteine codieren, darunter Zytokine, Chemokine und verschiedene Enzyme. Es sorgt so für die Chemotaxis von Entzündungszellen wie Granulozyten, Lymphozyten oder Monozyten zum Ort der Entzündung und unterhält den Entzündungsprozess durch verschiedene Proteine, wie etwa TNF- $\alpha$  [73]. Seinerseits wird NF $\kappa$ B durch unterschiedliche Stimuli aktiviert. Einige davon, wie etwa IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , werden wiederum durch NF $\kappa$ B hochreguliert. Es entsteht ein sich selbst unterhaltender Prozess, der zu einer chronischen Inflammation des betroffenen Gewebes führen kann [73].

Bei einem chronisch-entzündlichem Krankheitsgeschehen wie der EPS könnte man erwarten, dass NF $\kappa$ B gemäß den oben vorgestellten Sachverhalten eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielt. In dieser Studie wurde die p65-Untereinheit des NF $\kappa$ B-Komplexes immunhistochemisch untersucht. Es zeigte sich, dass NF $\kappa$ B in nahezu allen Zellen markiert und somit nachgewiesen wurde. Erwartungsgemäß wurde in der statistischen Auswertung festgestellt, dass die immunreaktiven Scores bei EPS-Patienten tatsächlich am höchsten lagen.

Bei den Gesamt-IRS zeigten sich hoch signifikant höhere Werte in der EPS-Gruppe gegenüber der Urämie-Gruppe. Auch bei den Fibroblasten waren die IRS bei den EPS-Patienten am höchsten, auch wenn hier im Post-Test das Konfidenzintervall knapp verfehlt wurde. Hier wäre möglicherweise eine größere Fallzahl nötig gewesen, um mit der nötigen statistischen „Power“ eine Signifikanz zeigen zu können. Bei den Fibrozyten lagen die Werte in der PD-Gruppe signifikant höher im Vergleich mit der Urämie-Gruppe, die EPS-Gruppe lag auch hier nur knapp außerhalb des Signifikanzbereiches. In Mesothelien lagen die Werte der PD-Patienten ebenfalls signifikant höher als in der Urämie-Gruppe.

Bei den Gefäßen, Rundzellen und Granulozyten waren die IRS wiederum in der EPS-Gruppe am höchsten, jedoch auch hier knapp außerhalb des signifikanten Bereiches.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass NF $\kappa$ B an der Pathogenese der EPS beteiligt ist und im Laufe des Krankheitsverlaufes eine zunehmende Aktivität zeigt. Wie Strippoli et al herausfanden, hat NF $\kappa$ B auch im Rahmen der EMT eine hochregulierende Funktion [71]. Die EMT wiederum ist assoziiert mit dem „high transporter“-Status und damit ein möglicher Risikofaktor für die Entstehung der EPS [67, 107].

Interessant ist hierbei auch, dass Angiotensin II in der Lage ist, NF $\kappa$ B in erheblichem Maße zu stimulieren. Dabei vermittelt das AT II seine Wirkung über eine Inaktivierung von I $\kappa$ B, wobei sowohl AT<sub>1</sub>- als auch AT<sub>2</sub>-Rezeptoren beteiligt zu sein scheinen [175]. Wolf et al fanden heraus, dass sich die NF $\kappa$ B-Aktivität mit dem AT<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist PD 123319 in einer AT<sub>2</sub>R-positiven und AT<sub>1</sub>R-negativen Zellkultur reduzieren ließ, nicht jedoch mit dem AT<sub>1</sub>R-Antagonisten Losartan [6]. Insbesondere die Infiltration von inflammatorischen Zellen zum Ort der Entzündung scheint dabei über den AT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt zu sein. Zur effektiven Blockade der NF $\kappa$ B-Stimulation durch das RAAS sollten demzufolge ACE-Inhibitoren den AT<sub>1</sub>R-Antagonisten aus der Sartan-Stoffgruppe bevorzugt werden [175].

### **4.3 Diskussion der Laborparameter und klinischen Daten**

Bei der Auswahl der Studienpatienten für diese Arbeit wurden diese hinsichtlich ihrer persönlichen und klinischen Charakteristika „gematcht“. Das bedeutet, dass die erhobenen Charakteristika innerhalb und vor allem auch zwischen den Studiengruppen möglichst geringen Schwankungen unterliegen sollten. Durch dieses Vorgehen sollte die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöht werden, insbesondere mit Hinblick auf die Dauer der Peritonealdialyse bei den Patienten der PD- und bei der EPS-Gruppe.

Die statistische Auswertung zeigte sowohl für sämtliche persönlichen und klinischen Patientendaten als auch für die Laborparameter nicht signifikante Ergebnisse. Die durchschnittliche PD-Dauer betrug in der PD-Gruppe 55.1 Monate und 60.0 Monate in der EPS-Gruppe.

Insgesamt ist das Patientenkollektiv somit als nahezu perfekt gematcht anzusehen, die potentiellen Störeinflüsse wurden bestmöglich ausgeschaltet. Die histologischen und immunhistochemischen Beobachtungen in dieser Studie sind ergo mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die pathologischen Prozesse während der Peritonealdialyse zurückzuführen.

Die gematchte Dauer der Peritonealdialyse in der PD- und der EPS-Gruppe erhöht zudem die Aussagekraft der beobachteten Veränderungen zwischen diesen Gruppen, da die Veränderungen folglich nicht auf die PD-Expositionsdauer zurückführbar sind.

#### 4.4 Fazit - Zukunft der EPS in Therapie und Forschung

Durch die Ergebnisse dieser Studie wurden nach Kenntnis des Autors erstmals die wichtigsten Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im menschlichen Peritoneum mittels Immunhistochemie nachgewiesen. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass das RAAS die Funktion eines parakrines Gewebehormon im Peritoneum besitzt.

Aufgrund seiner dargelegten Eigenschaften ist eine hypothetische Beteiligung des RAAS bei fibrotisch-entzündlichen Prozessen im Rahmen der Peritonealdialyse argumentativ plausibel. In dieser Arbeit konnte diese Hypothese durch eine reduzierte Expression von ACE 2 im Peritoneum bei EPS-Patienten möglicherweise untermauert werden. Eine erhöhte Aktivität der profibrotischen ACE 1-/AT II-/AT<sub>1</sub>R-Achse und konsekutiv des Aldosterons lässt sich anhand der Studienergebnisse vermuten, wenn auch nicht abschließend beweisen.

In vorangegangenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnten vorteilhafte Effekte einer Blockade des RAAS in Zellkulturen beziehungsweise Tiermodellen festgestellt werden. Daten zur Wirksamkeit solcher Therapien bei EPS-Patienten stammen bislang aus retrospektiven Beobachtungen und zeigen zum Teil ermutigende Resultate. Randomisierte, doppelt verblindete Therapiestudien im Sinne einer 1a-Evidenz sind bislang nicht durchgeführt worden. Aufgrund der niedrigen Inzidenz der EPS ist für eine solide Datengrundlage mit suffizientem Stichprobenumfang ein Multi-Center-Ansatz auf internationaler Ebene erstrebenswert.

Der Nachweis des Vitamin D-Rezeptors im Peritoneum eröffnet eine weitere Möglichkeit, Einfluss auf die Entzündungs- und Fibrose- Prozesse bei der Peritonealdialyse zu nehmen. Die allgemein anerkannten, antifibrotischen und antiinflammatorischen Wirkungen des Vitamin D könnten möglicherweise auch im Peritoneum ausgenutzt werden, zumal die Prävalenz von Vitamin D-Mangel bei PD-Patienten äußert hoch ist.

Ein potentieller Mechanismus dieser Wirkungen könnte dabei sowohl über

eine Dämpfung des RAAS als auch über direkten Einfluss auf die wichtigen EPS-begünstigenden Mediatoren TGF- $\beta$ 1 und NF $\kappa$ B erfolgen. Beide angesprochenen Zytokine wurden in dieser Studie im Peritoneum nachgewiesen, im Falle des NF $\kappa$ B zeigte sich außerdem eine mögliche Hochregulation im Verlaufe der EPS.

Diese Arbeit liefert wertvolle Erkenntnisse über die Expression bedeutender, pharmakologisch beeinflussbarer Komponenten des RAAS und gibt wichtige Anstöße für weiterführende Studien zur Therapie und Prävention der EPS und der peritonealen Fibrose.

Insgesamt kann das RAAS als interessanter Angriffspunkt für die Etablierung neuer Behandlungsstrategien der peritonealen Fibrose angesehen werden. Weitere Grundlagenforschung zur Aufklärung der multifaktoriellen Pathogenese der EPS, in welcher dem RAAS sicherlich nur eine Teilrolle zukommt, wird jedoch nötig sein, um dieser mit hoher Morbidität und Mortalität verbundenen Erkrankung wirksame medikamentöse Therapien entgegensetzen zu können.

## Zusammenfassung

Diese experimentelle Studie untersuchte mit immunhistochemischen Methoden die Expression des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sowie des Vitamin D-Rezeptors und der Zytokine TGF- $\beta$ 1 und NF $\kappa$ B im menschlichen Peritoneum. Zudem wurde durch den Vergleich verschiedener Stadien der peritonealen Fibrose eine mögliche Beteiligung dieser Moleküle beziehungsweise der zugrundeliegenden Hormonachsen bei der Pathogenese der enkapsulierenden Peritonealsklerose (EPS) untersucht.

Insgesamt wurden 49 Patienten in die Studie eingeschlossen und in die Gruppen der Urämie, der Peritonealfibrose und der EPS eingeteilt. Die untersuchten Gewebeproben wurden im Rahmen operativer Eingriffe zu definierten Zeitpunkten mit Einverständnis der Patienten gewonnen, zudem wurden verschiedene klinische Charakteristika und persönliche Daten der Patienten erhoben. Hinsichtlich dieser Daten wurde das Patientenkollektiv „gematcht“, um die Vergleichbarkeit der beobachteten Ergebnisse zu erhöhen.

Alle untersuchten Moleküle konnten mit immunhistochemischen Methoden in den Peritonealgeweben nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Blutgefäße in EPS-Patienten signifikant niedrigere immunreaktive Scores (IRS) für das Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE 2) aufwiesen ( $p < 0.05$ ). Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass der Mineralocorticoid-Rezeptor in Blutgefäßen von EPS-Patienten eine erhöhte Aktivität zeigt ( $p < 0.01$ ). Darüber hinaus zeigte die Auswertung der NF $\kappa$ B-Ergebnisse, dass EPS-Patienten die höchsten IRS erzielten ( $p < 0.01$ ).

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass das RAAS eine wichtige Rolle in der Entstehung der EPS spielen könnte. Aus einer verminderten Aktivität des ACE 2-vermittelten Signalwegs könnte ein Überwiegen des als profibrotisch angesehenen ACE 1-/AT II-/AT<sub>1</sub>R-Signalwegs mit hierdurch induzierter

Aldosteron-Aktivierung resultieren. Ebenso scheint der wichtige Entzündungsmediator NF $\kappa$ B im Rahmen der EPS hochreguliert zu sein.

Aus dieser Arbeit ergeben sich relevante Erkenntnisse über die Expression wichtiger Bestandteile des RAAS im Peritoneum. Zudem wurde ein möglicher Pathomechanismus über dieses Hormonsystem aufgezeigt, welcher Anregungen für weiterführende Grundlagenforschung gibt.

## Literaturverzeichnis

- [1] Schmidt, Lang, Heckmann. *Physiologie des Menschen*. 31. Aufl. Berlin: Springer-Verlag; 2011.
- [2] Stanton A. Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2003;3:389–94.
- [3] Atlas SA. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *J Manag Care Pharm*. 2007;13(8):S9–S20.
- [4] Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*. 2006;86:747–803.
- [5] Rosenkranz S. TGF- $\beta$ 1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004;63:423–432.
- [6] Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RAK, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B through AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Kidney Int*. 2002;61:1986–1995.
- [7] Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, Deans T, Maalouf SA, Gratze P, et al. Regulation of T-cell function by endogenously produced Angiotensin II. *Am J Physiol*. 2009;296:R208–R216.
- [8] Reudelhuber TL. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:155–59.
- [9] Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000;87:e1–e9.
- [10] Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W. The Physiological Significance of the Alternative Pathways of Angiotensin II Production. *J Physiol Pharmacol*. 2006;56:529–539.
- [11] Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 2007;50:1093–1098.
- [12] Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1560–H1566.
- [13] Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H732–H742.

- [14] Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8258–8263.
- [15] Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem*. 2004;279:16754–16766.
- [16] Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhager JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Clin Endocrinol*. 2000;52:211–216.
- [17] Sergeev IN. Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced apoptosis. *J Steroid Biochem*. 2004;89-90(1-5):419–425.
- [18] Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol*. 2003;49:277–300.
- [19] Kong J, Qiao G, Zhang Z, Liu SQ, Li YC. Targeted vitamin D receptor expression in juxtaglomerular cells suppresses renin expression independent of parathyroid hormone and calcium. *Kidney Int*. 2008;74:1577–1581.
- [20] Qiao G, Kong J, Uskokovic M, Li YC. Analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as novel inhibitors of renin biosynthesis. *J Steroid Biochem*. 2005;96:59–66.
- [21] Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology*. 1984;115:1476–1483.
- [22] Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol*. 2004;18:2660–2671.
- [23] Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub>: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol*. 1981;77(1):51–8.
- [24] Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Renal Physiol*. 2004;289:F8–F28.
- [25] Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med*. 2002;112(8):659–662.
- [26] Max Rubner-Institut. Nationale Verzehrsstudie II: Ergebnisbericht Teil 2. Karlsruhe; 2008.
- [27] IOM Institute of Medicine. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington, DC: The National Academic Press; 2011.

- [28] Lowdon J. Rickets: concerns over the worldwide increase. *J Fam Health Care*. 2011;21(2):25–9.
- [29] Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6):1678S–1688S.
- [30] Kuhlmann U, Walb D, Böhler J, Luft FC. *Nephrologie*. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008.
- [31] Taskapan H, Ersoy FF, Passadakis PS, Tam P, Memmos DE, Katopodis KP, et al. Severe vitamin D deficiency in chronic renal failure patients on peritoneal dialysis. *Clin Nephrol*. 2006;66(4):247–255.
- [32] Shah N, Bernardini J, Piraino B. Prevalence and correction of 25(OH) vitamin D deficiency in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*. 2005;25(4):362–366.
- [33] Frei U, Schober-Halstenberg HJ. *Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007*. Berlin: QuaSi Niere; 2008.
- [34] Negoj D, Nolph KD. *Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis*. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag; 2009.
- [35] Wegner G. Chirurgische Bemerkungen über die Peritonealhöhle mit besonderer Berücksichtigung der Ovariectomie. *Arch Klin Chir*. 1877;20:51.
- [36] Cunningham RS. The physiology of the serous membranes. *Am J Physiol*. 1920;53:488–494.
- [37] Putnam TJ. The living peritoneum as a dialyzing membrane. *Am J Physiol*. 1923;63:548–565.
- [38] Ganter G. Über die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blute durch Dialyse. *Munch Med Wochenschr*. 1923;70:1478–1481.
- [39] Boen ST, Mulinari AS, Dillar DH. Periodic peritoneal dialysis in the management of chronic uremia. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1962;8:256–262.
- [40] Boen ST, Mion CM, Curtis FK. Periodic peritoneal dialysis using the repeated puncture technique and an automatic cycling machine. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1964;10:946–947.
- [41] Tenckhoff H, Schechter HA. Bacteriologically safe peritoneal access device. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1968;14:181–187.
- [42] Tenckhoff H, Curtis FK. Experience with maintenance peritoneal dialysis in the home. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1970;16:90–95.
- [43] Popovich RP, Moncrief JW, F DJ. The definition of a novel portable/wearable equilibrium dialysis technique. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1976;5:64.

- [44] Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med.* 1978;88(4):449–455.
- [45] Heaf JG, Løkkegaard H, Madsen M. Initial survival advantage of peritoneal dialysis relative to hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:112–117.
- [46] Weinhandl ED, Foley RN, Gilbertson DT, Arneson TJ, Snyder JJ, Collins AJ. A Propensity-matched mortality comparison of incident hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:499–506.
- [47] Mehrotra R, Chiu YW, Kalantar-Zadeh K, Bargman J, Vonesh E. Similar outcomes with hemodialysis and peritoneal dialysis in patients with end-stage renal disease. *Arch Intern Med.* 2011;171(2):110–118.
- [48] Chaudhary K, Sangha H, Khanna R. Peritoneal Dialysis First: Rationale. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6:447–456.
- [49] Jain AK, Blake P, Cordy P, Garg AX. Global Trends in Rates of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:533–544.
- [50] U.S. Renal Data System. *USRDS 2012 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States.* Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease; 2012.
- [51] Finkelstein FO, Abu-Aisha H, Najafi I, Lo WK, Abraham G, Pecoits-Filho R, et al. PD in the developing world. *Perit Dial Int.* 2009;29:618–622.
- [52] Nayak KS, Prabhu MV, Sinoj KA, Subhramanayam SV, Sridhar G. Peritoneal Dialysis in Developing Countries. *Contrib Nephrol.* 2009;163:270–277.
- [53] Just PM, de Charro FT, Tschosik EA, Bhattacharyya SK, Riella MC. Reimbursement and economic factors influencing dialysis modality choice around the world. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:2365–2373.
- [54] van Biesen W, Veys n, Lameire N, Vanholder R. Why less success of the peritoneal dialysis programmes in Europe? *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:1478–1481.
- [55] Churchill DN, Thorpe KE, Nolph KD, Keshaviah PR, Oreopoulos DG, Pagé D. Increased Peritoneal Membrane Transport is Associated with Decreased Patient and Technique Survival for Continuous Peritoneal Dialysis Patients. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1285–1292.
- [56] Combet S, Ferrier ML, van Landshoot M, Stoenoiu M, Moulin P, Miyata T, et al. Chronic Uremia Induces Permeability Changes, Increased Nitric Oxide Synthase Expression, and Structural Modifications in the Peritoneum. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:2146–2157.

- [57] Williams JD, Craig KJ, Topley N, von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al. Morphologic Changes in the Peritoneal Membrane of Patients with Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:470–479.
- [58] Flessner MF. Peritoneal ultrafiltration: physiology and failure. *Contrib Nephrol.* 2009;163:7–14.
- [59] Nakayama M, Kawaguchi Y, Yamada K, Hasegawa T, Kazunori T, Naohiko K, et al. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end-products in the peritoneum and its possible pathophysiological role in CAPD. *Kidney Int.* 1997;51:182–186.
- [60] Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biological basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315–1321.
- [61] Schalkwijk CG, Posthuma N, ten Brink HJ, ter Wee PM, Teerlink T. Induction of 1,2-dicarbonyl compounds, intermediates in the formation of advanced glycation end-products, during heat-sterilization of glucose-based peritoneal dialysis fluids. *Perit Dial Int.* 1999;19:325–333.
- [62] Schwenger V, Morath C, Salava A, Amann K, Seregin Y, Deppisch R, et al. Damage to the Peritoneal Membrane by Glucose Degradation Products Is Mediated by the Receptor for Advanced Glycation End-Products. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:199–207.
- [63] Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2000;114(4):717–728.
- [64] Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, et al. Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *N Engl J Med.* 2003;348:403–413.
- [65] Yang H, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 2003;63:1530–1539.
- [66] Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, et al. Transient Overexpression of TGF- $\beta$ 1 Induces Epithelial Mesenchymal Transition in the Rodent Peritoneum. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:426–436.
- [67] del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Aroeira LS, Aguilera A, Fernández-Perpén A, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney Int.* 2008;73:S26–S33.
- [68] Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *New Engl J Med.* 2000;342(18):1350–1358.

- [69] Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II Stimulates Extracellular Matrix Protein Synthesis through Induction of Transforming Growth Factor- $\beta$  Expression in Rat Glomerular Mesangial Cells. *J Clin Invest.* 1994;93:2431–2437.
- [70] Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int.* 1997;52:1497–1510.
- [71] Strippoli R, Benedicto I, Pérez Lozano ML, Cerezo A, López-Cabrera M, del Pozo MA. Epithelial-to-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells is regulated by an ERK/NF- $\kappa$ B/Snail1 pathway. *Dis Model Mech.* 2008;1(4-5):264–274.
- [72] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, Mauri C, Bicknell C, Foxwell B. Canonical pathway of nuclear factor  $\kappa$  B activation selectively regulates pro-inflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *P NATL ACAD SCI USA.* 2004;101(15):5634–5639.
- [73] Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- $\kappa$ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med.* 1997;336(15):1066–1071.
- [74] Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation.* 1997;95(6):1532–1541.
- [75] Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II Participates in Mononuclear Cell Recruitment in Experimental Immune Complex Nephritis Through Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Synthesis. *J Immunol.* 1998;161:430–439.
- [76] Hoff CM. In vitro biocompatibility performance of physioneal. *Kidney Int Suppl.* 2003;88:S57–S74.
- [77] Cooker LA, Holmes CJ, Hoff CM. Biocompatibility of icodextrin. *Kidney Int Suppl.* 2002;62:S34–S45.
- [78] Bargman JM. Advances in Peritoneal Dialysis: A Review. *Semin Dialysis.* 2012;25(5):545–549.
- [79] Johnson DW, Brown FG, Clarke M, Boudville N, Elias TJ, Foo MW, et al. Effects of biocompatible versus standard fluid on peritoneal dialysis outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(6):1097–1107.
- [80] Aguirre AR, Abensur H. Protective measures against ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients. *Clinics.* 2011;66(12):2151–2157.

- [81] Nakamoto H. Encapsulating Peritoneal Sclerosis - A Clinician's Approach to Diagnosis and Medical Treatment. *Perit Dial Int.* 2005;25:S30–S38.
- [82] Owtschinnikow PJ. Peritonitis chronica fibrosa incapsulata. *Arch Klin Chir.* 1907;83:623–634.
- [83] Tannoury JN, Abboud BN. Idiopathic sclerosing encapsulating peritonitis: Abdominal cocoon. *World J Gastroenterol.* 2012;18(17):1999–2004.
- [84] Kawanishi H, Kawaguchi Y, Fukui H, Hara S, Imada A, Kubo H. Encapsulating peritoneal sclerosis in Japan: a prospective, controlled, multicenter study. *Am J Kidney Dis.* 2004;44(4):729–737.
- [85] Johnson DW, Cho Y, Livingston B, Hawley CM, McDonald SP, Brown FG, et al. Encapsulating peritoneal sclerosis: incidence, predictors, and outcomes. *Kidney Int.* 2009;77:904–912.
- [86] Brown MC, Simpson K, Kerssens JJ, Mactier RA. Encapsulating Peritoneal Sclerosis in the New Millennium: A National Cohort Study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1222–1229.
- [87] Bansal S, Sheth H, Siddiqui N, Bender FH, Johnston JR, Piraino B. Incidence of Encapsulating Peritoneal Sclerosis at a Single U.S. University Center. *Adv Perit Dial.* 2010;26:75–81.
- [88] Gayomali C, Hussein U, Cameron SF, Protopapas Z, Finkelstein FO. Incidence of Encapsulating Peritoneal Sclerosis at a Single U.S. University Center. *Perit Dial Int.* 2011;31:279–286.
- [89] Garosi G, Di Paolo N, Sacchi G, Gaggiotti E. Sclerosing peritonitis: a nosological entity. *Perit Dial Int.* 2005;25(S3):S110–S112.
- [90] Fieren MW, Betjes MG, Korte MR, Boer WH. Posttransplant encapsulating peritoneal sclerosis: a worrying new trend? *Perit Dial Int.* 2007;27:619–624.
- [91] Kawaguchi Y, Kawanishi H, Mujais S, Topley N, Oreopoulos DG. Encapsulating peritoneal sclerosis: definition, etiology, diagnosis, and treatment. *International Society for Peritoneal Dialysis ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis.* *Perit Dial Int.* 2000;20(S4):S43–S55.
- [92] Augustine T, Brown PW, Davies SD, Summers AM, Wilkie ME. Encapsulating peritoneal sclerosis: clinical significance and implications. *Nephron Clin Pract.* 2009;111:c149–c154.
- [93] Campbell S, Clarke P, Hawley C, Wigan M, Kerlin P, Butler J. Sclerosing peritonitis: identification of diagnostic, clinical, and radiological features. *Am J Kidney Dis.* 1994;24:819–825.

- [94] Honda K, Oda H. Pathology of encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int.* 2005;25(4):S19–S29.
- [95] Braun N, Fritz P, Ulmer C, Latus J, Kimmel M, Biegger D, et al. Histological Criteria for Encapsulating Peritoneal Sclerosis - A Standardized Approach. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e48647.
- [96] Kittur DS, Korpe SW, Raytch RE, Smith GW. Surgical aspects of sclerosing encapsulating peritonitis. *Arch Surg.* 1990;125:1626–1628.
- [97] Habib SM, Betjes MG, Fieren MW, Boeschoten EW, Abrahams AC, Boer WH, et al. Management of encapsulating peritoneal sclerosis: a guideline on optimal and uniform treatment. *Neth J Med.* 2011;69(11):500–507.
- [98] van Bommel EF, Hendriksz TR, Huiskes AW, Zeegers AG. Brief communication: tamoxifen therapy for nonmalignant retroperitoneal fibrosis. *Ann Intern Med.* 2006;144:101–106.
- [99] Korte MR, Fieren MW, Sampomon DE, Lingsma HF, Weimar W, Betjes MG. Tamoxifen is associated with lower mortality of encapsulating peritoneal sclerosis: results of the Dutch multicentre EPS study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;26(2):691–697.
- [100] Lo WK, Kawanishi H. Encapsulating peritoneal sclerosis and surgical treatment. *Perit Dial Int.* 2009;29(2):S211–S214.
- [101] Cornelis T, Oreopoulos DG. Update on potential medical treatments for encapsulating peritoneal sclerosis; human and experimental data. *Int Urol Nephrol.* 2011;43:147–156.
- [102] Li YC. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int.* 2010;78:134–139.
- [103] Alscher MD, Braun N, Biegger D, Fritz P. Peritoneal mast cells in peritoneal dialysis patients, particularly in encapsulating peritoneal sclerosis patients. *Am J Kidney Dis.* 2007;49(3):452–61.
- [104] Gandhi VC, Humayun HM, Ing TS, Daugirdas JT, Jablockow VR, Iwatsuki S. Sclerotic thickening of the peritoneal membrane in maintenance peritoneal dialysis patients. *Arch Intern Med.* 1980;140:1201–1203.
- [105] Denis J, Paineau J, Potel G, Fontenaille C, Guenel J. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Arch Intern Med.* 1980;93:508.
- [106] Nakayama M, Maruyama Y, Numata M. Encapsulating peritoneal sclerosis is a separate entity: con. *Perit Dial Int.* 2005;25(S3):S107–S109.
- [107] Yamamoto R, Nakayama M, Hasegawa T, Miwako N, Yamamoto H, Yokoyami K. High-transport membrane is a risk factor for encapsulating peritoneal sclerosis developing after long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis treatment. *Adv Perit Dial.* 2002;18:131–134.

- [108] Yamamoto R, Otsuka Y, Nakayama M, Maruyama Y, Katoh N, Ikeda M, et al. Risk factors for encapsulating peritoneal sclerosis in patients who have experienced peritoneal dialysis treatment. *Clin Exp Nephrol*. 2005;9(2):148–152.
- [109] Korte MR, Sampimon DE, Lingsma HF, Fieren MW, Looman CW, Zietse R, et al. Risk factors associated with encapsulating peritoneal sclerosis in Dutch EPS study. *Perit Dial Int*. 2011;31(3):269–278.
- [110] Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 1991;9:17–22.
- [111] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:881–900.
- [112] Fernandez LA, Twickler J, Mead A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med*. 1985;105:141–145.
- [113] Imai H, Nakamoto H, Ishida Y, Yamanouchi Y, Inoue T, Okada H, et al. Renin-angiotensin system plays an important role in the regulation of water transport in the peritoneum. *Adv Perit Dial*. 2001;17:20–24.
- [114] Kim YL. Update on mechanisms of ultrafiltration failure. *Perit D*. 2009;29(2):S123–127.
- [115] Noh H, Ha H, Yu MR, Kim YO, Kim JH, Lee HB. Angiotensin II mediates high glucose-induced TGF- $\beta$ 1 and fibronectin upregulation in HPMC through reactive oxygen species. *Perit Dial Int*. 2005;25:38–47.
- [116] Nakamoto H, Imai H, Fukushima R, Ishida Y, Yamanouchi Y, Suzuki H. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int*. 2008;28(S3):S83–S87.
- [117] Kiribayashi K, Masaki T, Naito T, Ogawa T, Ito T, Yorioka N, et al. Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38 MAPK. *Kidney Int*. 2005;67(3):1126–1135.
- [118] Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, et al. Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(2):245–255.
- [119] Sauter M, Cohen CD, Wörnle M, Mussack T, Ladurner R, Sitter T. ACE Inhibitor and AT1-Receptor Blocker attenuate the production of VEGF in mesothelial cells. *Perit Dial Int*. 2007;27:167–172.
- [120] Duman S, Günal AI, Sen S, Asçi G, Özkahya E M Terzioglu, Akçiçek F, et al. Does enalapril prevent peritoneal fibrosis induced by hypertonic (3.86%) peritoneal dialysis solution? *Perit Dial Int*. 2001;21(2):219–225.

- [121] Ersoy R, Celik A, Yilmaz O, Sarioglu S, Sis B, Akan P, et al. The Effects of Irbesartan and Spironolactone in Prevention of Peritoneal Fibrosis in Rats. *Perit Dial Int.* 2007;27:424–431.
- [122] Pérez-Martínez J, Pérez-Martínez FC, Carrión B, Masiá J, Ortega A, Simarro E, et al. Aliskiren Prevents the Toxic Effects of Peritoneal Dialysis Fluids during Chronic Dialysis in Rats. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e36268.
- [123] Kolesnyk I, Noordzij M, Dekker FW, Boeschoten EW, Krediet RT. A positive effect of AII inhibitors on peritoneal membrane function in long-term PD patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24:272–277.
- [124] Fang W, Oreopoulos DG, Bargman JM. Use of ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers and survival in patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23:3704–3710.
- [125] Jing S, Kezhou Y, Hong Z, Qun W, Rong W. Effect of renin-angiotensin system inhibitors on prevention of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis patients. *Nephrology.* 2010;15:27–32.
- [126] van Tassel BW, Munger MA. Aliskiren for renin inhibition: a new class of antihypertensives. *Ann Pharmacother.* 2007;41(3):456–464.
- [127] Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the components of the renin-angiotensin system in human tissues: quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest.* 1993;91:2058–2064.
- [128] Danser AH, van Kesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, et al. Prorenin, renin, angiotensinogen and ACE in normal or failing hearts: evidence for renin binding. *Circulation.* 1997;96:220–226.
- [129] Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int.* 1996;50(6):1897–1903.
- [130] Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, L Yu L, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor- $\beta$ 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* 2006;69:105–113.
- [131] Kaneshiro Y, Ichihara A, Sakoda M, Takemitsu T, Nurun Nabi AHM, Nasir Uddin M, et al. Slowly Progressive, Angiotensin II-Independent Glomerulosclerosis in Human (Pro)renin Receptor-Transgenic Rats. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1789–1795.
- [132] Clavreul N, Sansilvestri-Morel P, Magard D, Verbeuren TJ, Rupin A. (Pro)renin promotes fibrosis gene expression in HEK cells through a Nox4-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300:F1310–F1318.

- [133] Batenburg WW, de Bruin RJ, van Gool JM, Müller DN, Bader M, Nguyen G, et al. Aliskiren-binding increases the half life of renin and prorenin in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 2008;28(6):1151–1157.
- [134] Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(11):1211–1222.
- [135] Danser AH. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension.* 1994;24:37–48.
- [136] Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, et al. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis.* 2008;51(4):613–623.
- [137] Montecucco F, Pende A, Mach F. The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediat Inflamm.* 2009;752406.
- [138] Zhang W, Miao JF, Li PF, Wang YX, Zhang YS. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in liver fibrosis in the rat induced by CCL<sub>4</sub>. *Res Vet Sci.* 2013;95:54–58.
- [139] Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II - induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993;73:413–423.
- [140] Capettini LS, Montecucco F, Mach F, Stergiopoulos N, Santos RA, da Silva RF. Role of renin-angiotensin system in inflammation, immunity and aging. *Curr Pharm Des.* 2012;18:963–970.
- [141] Zhang J, Noble NA, Border WA, Huang Y. Infusion of angiotensin-(1-7) reduces glomerulosclerosis through counteracting angiotensin II in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298:F579–F588.
- [142] Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Díez-Freire C, Dooies A. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Resp Crit Care Med.* 2010;182:1065–1072.
- [143] Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Aoki T, Ohashi Y, Miyagi M, et al. Increased ACE and decreased ACE2 expression in kidneys from patients with IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2011;117(1):c57–c66.
- [144] Velkoska E, Dean RG, Burchill L, Levidiotis V, Burrell LM. Reduction in renal ACE2 expression in subtotal nephrectomy in rats is ameliorated with ACE inhibition. *Clin Sci (Lond).* 2010;118(4):269–279.

- [145] Oudit GY, Liu GC, Zhong J, Basu R, Chow FL, Zhou J, et al. Human recombinant ACE2 reduces the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2010;59(2):529–538.
- [146] Li X, Molina-Molina M, Abdul-Hafez A, Uhal V, Xaubet A, Uhal BD. Angiotensin converting enzyme-2 is protective but downregulated in human and experimental lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295:L178–L185.
- [147] Chen Q, Yang Y, Huang Y, Pan C, Liu L, Qiu H. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of Mas receptor in acute lung injury. *J Surg Res*. ePub ahead of print Jul 17;2013;doi: 10.1016/j.jss.2013.06.052.
- [148] Pan CH, Lin JL, Lai LP, Chen CL, Huang SK, Lin CS. Downregulation of angiotensin converting enzyme II is associated with pacing-induced sustained atrial fibrillation. *FEBS Lett*. 2007;581:526–534.
- [149] Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2001;37:1141–1146.
- [150] Heitsch H, Brovkovych S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension*. 2001;37:72–76.
- [151] Lijnen P, Petrov V. Induction of Cardiac Fibrosis by Aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:865–879.
- [152] Duprez D, de Buyzere M, Rietzchel ER, Clement DL. Aldosterone and vascular damage. *Curr Hypertens Rep*. 2000;2:227–234.
- [153] Epstein M. Aldosterone as a mediator of progressive renal disease: pathogenic and clinical implications. *Am J Kidney Dis*. 2001;37:677–688.
- [154] Nishimura H, Ito Y, Mizuno M, Tanaka A, Morita Y, Maruyama S, et al. Mineralocorticoid receptor blockade ameliorates peritoneal fibrosis in new rat peritonitis model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(5):F1084–F1093.
- [155] Okazaki A, Mori Y, Nakata M, Kimura T, Sonomura K, Sakoda C, et al. Peritoneal Mesothelial Cells as a Target of Local Aldosterone Action: Upregulation of Connective Tissue Growth Factor Expression via Serum- and Glucocorticoid-Inducible Protein Kinase 1. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32:151–160.
- [156] Yamahara H, Kishimoto N, Nakata M, Okazaki A, Kimura T, Sonomura K, et al. Direct Aldosterone Action as a Profibrotic Factor via ROS-Mediated SGK1 in Peritoneal Fibroblasts. *Kidney Blood Press Res*. 2009;32:185–193.
- [157] Norman AW. Vitamin D Receptor: New Assignments for an Already Busy Receptor. *Endocrinology*. 2006;147(12):5542–5548.

- [158] Braun N, Fritz P, Biegger D, Kimmel M, Reimold F, Ulmer C, et al. Difference in the expression of hormone receptors and fibrotic markers in the human peritoneum—implications for therapeutic targets to prevent encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int.* 2011;31(3):291–300.
- [159] Yuan W, Pan W, Kong J, Zhen W, Szeto FL, Wong KE. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Suppresses Renin Gene Transcription by Blocking the Activity of the Cyclic AMP Response Activity of the Cyclic AMP Response. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29821–29830.
- [160] Forman JP, Williams JS, Fisher NDL. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Regulation of the Renin-Angiotensin System in Humans. *Hypertension.* 2010;55:1283–1288.
- [161] Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Watanabe M, Kashiwagi K, et al. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science.* 1999;283(5406):1317–1321.
- [162] Aschenbrenner JK, Sollinger HW, Becker BN, Hullet DA. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Alters the Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Pathway in Renal Tissue. *J Surg Res.* 2001;100:171–175.
- [163] Yang L, Wang J, Fan Y, Chen S, Wang L, Ma J. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on rat peritoneal mesothelial cells treated with high glucose plus lipopolysaccharide. *Cell Immunol.* 2011;271:173–179.
- [164] Szeto FL, Sun J, Kong J, Duan Y, Liao A, Madara JL, et al. Involvement of the Vitamin D Receptor in the Regulation of NF- $\kappa$ B Activity in Fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103(3-5):563–566.
- [165] Deb DK, Chen Y, Zhang Z, Zhang Y, Szeto FL, Wong KE, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses high glucose-induced angiotensinogen expression in kidney cells by blocking the NF- $\kappa$ B pathway. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296:F1212–F1218.
- [166] Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:616–630.
- [167] Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF- $\beta$  family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol.* 2007;9:1000–1004.
- [168] Lan HY. Diverse Roles of TGF- $\beta$ /Smads in Renal Fibrosis and Inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7:1056–1067.
- [169] Kang DH, Hong YS, Lim HJ, Choi JH, Han DS, Yoon KI. High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor- $\beta$ 1 of human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokine costimulation. *Perit Dial Int.* 1999;19(3):221–230.

- [170] De Vriese AS, Tilton RG, Mortier S, Lameire NH. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:2549–2555.
- [171] Serie K, Fukuda N, Nakai S, Matsuda H, Maruyama T, Murayama Y, et al. Pyrrole-Imidazole Polyamide targeting transforming growth factor  $\beta$ 1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int*. 2012;32:462–472.
- [172] Loureiro J, Sandoval P, del Peso G, Guadalupe González-Mateo G, Fernández-Millara V, Santamaria B. Tamoxifen Ameliorates Peritoneal Membrane Damage by Blocking Mesothelial to Mesenchymal Transition in Peritoneal Dialysis. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61165.
- [173] Kyuden Y, Ito T, Masaki T, Yorioka N, Kohno N. TGF- $\beta$ 1 induced by high glucose is controlled by angiotensin-converting-enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker on cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int*. 2005;25:483–491.
- [174] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46:705–716.
- [175] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Egido J. Systemic Infusion of Angiotensin II into Normal Rats Activates Nuclear Factor- $\kappa$ B and AP-1 in the Kidney. *Am J Pathol*. 2001;158(5):1743–1756.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schaubild zum Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. . . . .	1
Abb. 2:	Schaubild zum erweiterten RAAS . . . . .	6
Abb. 3:	Schaubild zur Interaktion von Vitamin D und RAAS . . . . .	8
Abb. 4:	Schaubild zur Medianen Vitamin D-Zufuhr in % der empfohlenen Tageszufuhr . . . . .	10
Abb. 5:	Ätiologie der chron. Niereninsuffizienz in Deutschland . . . . .	11
Abb. 6:	Stadien der chronischen Niereninsuffizienz . . . . .	12
Abb. 7:	Verteilung der Patienten nach Dialyseversorgungsarten in Deutschland . . . . .	20
Abb. 8:	Schaubild zum Einfluss der Biokompatibilität auf peritoneales Ultrafiltrationsversagen . . . . .	26
Abb. 9:	CT-Scan bei EPS . . . . .	30
Abb. 10:	OP-Situs bei EPS . . . . .	31
Abb. 11:	Schaubild zum Prinzip der immunhistochemischen Färbetechnik .	38
Abb. 12:	Statistik: Übersicht klinische Daten & Laborwerte . . . . .	54
Abb. 13:	Statistik: Übersicht Auswertung HE-Färbung . . . . .	56
Abb. 14:	Statistik Renin: Menge gesamt . . . . .	59
Abb. 15:	Statistik Renin: IRS Mesothelien . . . . .	60
Abb. 16:	Statistik Renin: IRS Gefäße . . . . .	61
Abb. 17:	Statistik Renin: Anzahl positiver Mastzellen . . . . .	62
Abb. 18:	Statistik Renin: Intensität EZM . . . . .	63
Abb. 19:	Statistik AGT: Menge gesamt . . . . .	65
Abb. 20:	Statistik AGT: IRS Mesothelien . . . . .	66

Abb. 21: Statistik AGT: IRS Gefäße . . . . .	67
Abb. 22: Statistik AGT: Übersicht Mastzellen . . . . .	68
Abb. 23: Statistik AGT: Gesamtzahl positiver Mastzellen . . . . .	69
Abb. 24: Statistik AGT: Anzahl positiver Mastzellen, stark . . . . .	70
Abb. 25: Statistik AGT: Anzahl positiver Mastzellen, mäßig . . . . .	71
Abb. 26: Statistik AGT: Anzahl positiver Mastzellen, schwach . . . . .	72
Abb. 27: Statistik AGT: Übersicht Granulozyten . . . . .	73
Abb. 28: Statistik AGT: Gesamtzahl positiver Granulozyten . . . . .	74
Abb. 29: Statistik AGT: Anzahl positiver Granulozyten, stark . . . . .	75
Abb. 30: Statistik AGT: Anzahl positiver Granulozyten, mäßig . . . . .	76
Abb. 31: Statistik AGT: Anzahl positiver Granulozyten, schwach . . . . .	77
Abb. 32: Statistik AGT: Intensität EZM . . . . .	78
Abb. 33: Statistik ACE 1: Menge gesamt . . . . .	80
Abb. 34: Statistik ACE 1: IRS Gefäße . . . . .	81
Abb. 35: Statistik ACE 1: Intensität EZM . . . . .	82
Abb. 36: Statistik ACE 2: Menge gesamt . . . . .	84
Abb. 37: Statistik ACE 2: IRS Fibrozyten . . . . .	85
Abb. 38: Statistik ACE 2: IRS Fibroblasten . . . . .	86
Abb. 39: Statistik ACE 2: IRS Mesothelien . . . . .	87
Abb. 40: Statistik ACE 2: IRS Gefäße . . . . .	88
Abb. 41: Statistik ACE 2: IRS Rundzellen . . . . .	89
Abb. 42: Statistik ACE 2: IRS Granulozyten . . . . .	90
Abb. 43: Statistik ACE 2: Intensität EZM . . . . .	91

---

Abb. 44: Statistik MCR: Menge gesamt . . . . .	93
Abb. 45: Statistik MCR: IRS Fibrozyten . . . . .	94
Abb. 46: Statistik MCR: IRS Fibroblasten . . . . .	95
Abb. 47: Statistik MCR: IRS Mesothelien . . . . .	96
Abb. 48: Statistik MCR: IRS Gefäße . . . . .	97
Abb. 49: Statistik MCR: IRS Rundzellen . . . . .	98
Abb. 50: Statistik VDR: Menge gesamt . . . . .	100
Abb. 51: Statistik VDR: Fibrozyten . . . . .	101
Abb. 52: Statistik VDR: Fibroblasten . . . . .	102
Abb. 53: Statistik VDR: Mesothelien . . . . .	103
Abb. 54: Statistik VDR: Gefäße . . . . .	104
Abb. 55: Statistik VDR: Rundzellen . . . . .	105
Abb. 56: Statistik VDR: Granulozyten . . . . .	106
Abb. 57: Statistik VDR: Intensität EZM . . . . .	107
Abb. 58: Statistik TGF- $\beta$ 1: Menge gesamt . . . . .	109
Abb. 59: Statistik TGF- $\beta$ 1: IRS Fibrozyten . . . . .	110
Abb. 60: Statistik TGF- $\beta$ 1: IRS Fibroblasten . . . . .	111
Abb. 61: Statistik TGF- $\beta$ 1: IRS Mesothelien . . . . .	112
Abb. 62: Statistik TGF- $\beta$ 1: IRS Gefäße . . . . .	113
Abb. 63: Statistik TGF- $\beta$ 1: IRS Rundzellen . . . . .	114
Abb. 64: Statistik TGF- $\beta$ 1: IRS Granulozyten . . . . .	115
Abb. 65: Statistik TGF- $\beta$ 1: Intensität EZM . . . . .	116
Abb. 66: Statistik NF $\kappa$ B: Menge gesamt . . . . .	118

Abb. 67: Statistik NF $\kappa$ B: IRS Fibrozyten . . . . .	119
Abb. 68: Statistik NF $\kappa$ B: IRS Fibroblasten . . . . .	120
Abb. 69: Statistik NF $\kappa$ B: IRS Mesothelien . . . . .	121
Abb. 70: Statistik NF $\kappa$ B: IRS Gefäße . . . . .	122
Abb. 71: Statistik NF $\kappa$ B: IRS Rundzellen . . . . .	123
Abb. 72: Statistik NF $\kappa$ B: IRS Granulozyten . . . . .	124
Abb. 73: Statistik NF $\kappa$ B: Intensität EZM . . . . .	125
Abb. 74: Erläuterung der verwendeten Diagramme . . . . .	126
Abb. 75: Schaubild zur „two hit“-Hypothese . . . . .	128
Abb. 76: Übersicht Risikofaktoren für die EPS . . . . .	129
Abb. 77: Schaubild zum TGF- $\beta$ 1-Signalweg . . . . .	145
Abb. 78: Schaubild zum NF- $\kappa$ B-Signalweg . . . . .	148

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. M. Dominik Alscher, für das Überlassen des Dissertationsthemas und die Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Besonderem Dank bin ich Herrn PD Dr. Niko Braun verpflichtet, der mir als Betreuer und Ansprechpartner mit Rat und Tat zur Seite stand und sich immer Zeit für meine Anliegen genommen hat.

Desweiteren danke ich Dagmar Biegger, die mich in die immunhistochemische Methodik eingelernt hat und stets ein offenes Ohr und eine Lösung für allerlei Probleme bei der Laborarbeit parat hatte.

Ich danke Herrn Dr. Peter Fritz für die Hilfe bei der Auswertung, sowie für Tipps und Hinweise für korrektes wissenschaftliches Arbeiten. Herrn Christoph Scharpf danke ich für das freundliche Überlassen der Ergebnisse der HE-Schnitte. Ich danke außerdem den beteiligten Studienassistentinnen für ihre unermüdliche Arbeit bei der Erhebung der Patientencharakteristika und bei der Rekrutierung neuer Studienteilnehmer.

Ich möchte mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern, Wilhelm und Helga Lung, welche die Grundsteine gelegt und die Wege geebnet haben, die mich hierher brachten. Meinem Bruder Stephan Lung, für Freundschaft, Hilfe und Unterstützung wann immer ich sie am dringendsten benötigte.

Außerdem bedanke ich mich bei Andrea Dentler und Elena Wagner für das freundliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

<b>Name</b>	Christoph Michael Lung
<b>Staatangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Geburtsdaten</b>	27.04.1986, Ravensburg

### Ausbildung

<b>1993 – 1997</b>	Grund- und Hauptschule Schwieberdingen
<b>1997 – 2006</b>	Gymnasium Markgröningen: Allgemeine Hochschulreife
<b>2007 – 2013</b>	<b>Universität Tübingen: Studium der Humanmedizin</b>
08 – 09/2009	Famulatur Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Kardiologie
03 – 04/2010	Famulatur Orthopädische Klinik, Markgröningen, Sportorthopädie
09 – 10/2010	Famulatur Klinikum am Steinenberg, Reutlingen, Chirurgische Ambulanz und Notaufnahme
02 – 04/2011	Famulatur Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart, Nephrologie
2012 – 2013	Praktisches Jahr Marienhospital, Stuttgart, Wahlfach Radiologie
08 – 10/2012	Auslandsaufenthalt im Praktischen Jahr, Bristol Royal Infirmary, University Hospitals Bristol, England
03.05.2013	Ärztliche Prüfung

### Promotion

<b>2011 – 2015</b>	Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart Promotion zum Doktor der Medizin in der Abteilung für Nephrologie und allgemeine Innere Medizin.
--------------------	---