

Die Funktion neutrophiler Granulozyten im Aszites von Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose ist signifikant vermindert, jedoch reversibel nach Inkubation mit autologem Patientenplasma

Kumulative Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Christina Becker

Geburtsdatum/-ort: 31.12.1989 / Berlin

angefertigt an der: Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig,
am Institut für Klinische Immunologie und der Klinik
für Gastroenterologie und Rheumatologie, Sektion
Hepatologie

Betreuer: Herr Professor Dr. med. Ulrich Sack
Herr Professor Dr. med. Thomas Berg

Ko-Betreuer: Herr Dr. med. Cornelius Engelmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 12.12.2017

*In liebevoller Erinnerung
an meinen Großvater*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	2
1. Einleitung.....	3
1.1. Leberzirrhose und Aszites.....	3
1.2. Prognose	5
1.3. Bakterielle Infektionen und spontan bakterielle Peritonitis	5
1.4. Immundysfunktion des angeborenen Immunsystems	7
1.5. Peritoneale Funktion von Immunzellen des angeborenen Immunsystems.....	11
1.6. Ziel der Studie	12
2. Publikation.....	13
3. Zusammenfassung der Arbeit	29
4. Literaturverzeichnis	33
Darstellung des eigenen Beitrags	38
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	39
Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit	40
Danksagung.....	41
Anlagen	42

Abkürzungsverzeichnis

HVPG	<i>Hepatic venous pressure gradient</i> (Hepatisch-venöser Druckgradient)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis
ACLF	<i>Acute-on-chronic liver failure</i> (Akut-auf-chronisches Leberversagen)
PMNs	<i>Polymorphonuclear leukocytes/neutrophil granulocytes</i> (Polymorphkernige neutrophile Granulozyten)
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> (Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
E. coli	Escherichia coli
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
CAIDS	<i>Cirrhosis-associated immune dysfunction syndrome</i> (Zirrhose-assoziierte Immundysfunktion)
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ATP	Adenosintriphosphat
LPS	Lipopolysaccharid
PRRs	Pattern Recognition Receptors
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> (Toll-like Rezeptoren)
NLRs	<i>NOD-like receptors</i> (NOD-like Rezeptoren)
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
NO	Stickstoffmonoxid
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
IL	Interleukin
RES	Retikuloendotheliales System
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
CR	<i>Complement receptor</i> (Komplementrezeptor)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mögliche Ursachen für die Entstehung einer Leberzirrhose	3
Abbildung 2: Endotoxinkonzentrationen im Plasma bei dekompensierter Leberzirrhose	9
Abbildung 3: Ruhender oxidativer Burst und Phagozytosekapazität bei Patienten mit Leberzirrhose.....	10

1. Einleitung

1.1. Leberzirrhose und Aszites

Die Leberzirrhose stellt das Endstadium chronischer Lebererkrankungen dar (Wiegand und Berg 2013), welche letztendlich zu einem fibrotischen Umbau des Leberparenchyms, Regeneratknoten und einer Veränderung der hepatischen Gefäßstruktur führen (Pinzani et al. 2011). Die dafür verantwortliche Schädigung muss in der Regel über mehrere Jahre hinweg anhalten bevor sich eine Zirrhose ausbildet (Bataller und Brenner 2005). Hauptursachen in den Industriestaaten sind der chronische Alkoholmissbrauch, die chronischen Virusinfektionen Hepatitis C und B und die nichtalkoholische Steatohepatitis (Wiegand und Berg 2013, Tsochatzis et al. 2014). Weitere mögliche Ursachen sind in Abbildung 1 aufgeführt.

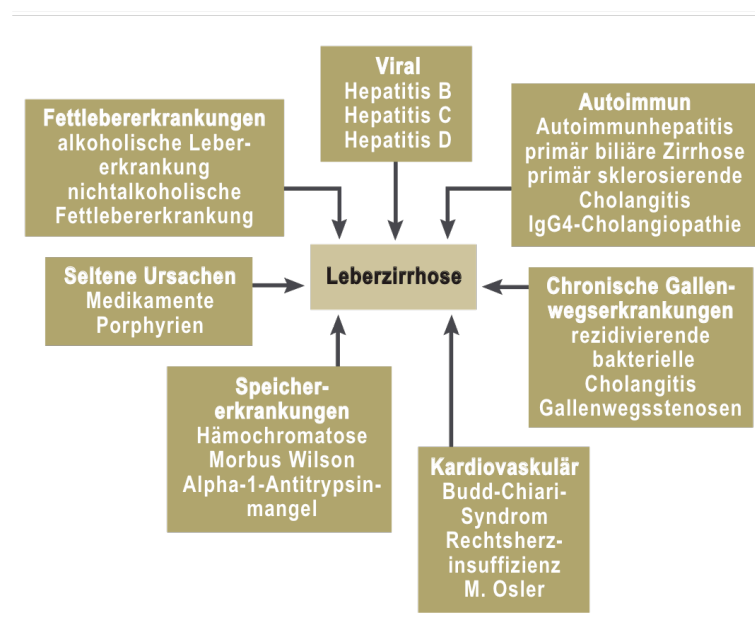


Abbildung 1: Mögliche Ursachen für die Entstehung einer Leberzirrhose (Wiegand und Berg 2013)

In frühen Phasen der Leberzirrhose können Patienten völlig frei von Symptomen sein (Arvaniti et al. 2010, Zipprich et al. 2012), da die Leber in der Lage ist ihre Funktion aufrecht zu erhalten (kompensiertes Stadium). Beim Fortschreiten der Erkrankung treten krankheitsspezifische Komplikationen auf, welche zu typischen Symptomen und dem Bild einer dekompensierten Leberzirrhose führen. Zu den Komplikationen zählen beispielsweise eine zunehmende Einschränkung der Lebersyntheseleistung (Terai und Tsuchiya 2017), die Ausbildung portokavaler Umgehungskreisläufe (Pinzani et al. 2011) wie etwa die Ösophagusvarizen, die hepatische Enzephalopathie (Arvaniti et al. 2010, Zipprich et al. 2012), das hepatorenale Syndrom (Gifford et al. 2017), sowie der Aszites (Arvaniti et al. 2010, Zipprich et al. 2012). Ein Großteil dieser Komplikationen entstehen auf Grundlage einer mit der Zirrhose verbundenen portalen Hypertension (Pinzani et al. 2011). Die Fibrosierung des Leberparenchyms sowie die Änderungen der Gefäßarchitektur erhöhen den intrahepatischen Gefäßwiderstand, so dass der Druck im vorgeschalteten Pfortaderstromgebiet ansteigt (Schuppan und Afdhal 2008, Tsochatzis et al. 2014). Definiert wird die portale Hypertension durch einen hepatisch-venösen Druckgradienten (HVPG) von über 5 mmHg. Bei Werten von über 10 mmHg kommt es zur Entstehung von Umgehungskreisläufen und Varizen. Steigt der Wert auf über 12 mmHg an, besteht ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Varizenblutung (Tetangco et al. 2016). Die häufigste Komplikation, die im Rahmen einer Dekompensation auftritt, ist jedoch der Aszites. Etwa 50 % der Patienten mit Leberzirrhose entwickeln diese Komplikation innerhalb von 10 Jahren (Annamalai et al. 2016). Aszites wird definiert als Flüssigkeitsansammlung im Peritoneum von mehr als 25 ml und tritt als Folge einer Transsudation von Flüssigkeit aus den Gefäßen in die Bauchhöhle auf. Dafür gibt es mehrere Gründe: In erster Linie ist der intravasale hydrostatische Druck der Splanchnikusgefäße durch die portale Hypertension erhöht und die Leber synthetisiert aufgrund einer Funktionseinschränkung weniger Proteine, insbesondere weniger Albumin. Als Folge sinkt der onkotische Druck in den Gefäßen und Flüssigkeit tritt in das Interstitium aus (Pericleous et al. 2016). Ein weiterer wesentlicher Mechanismus besteht in einer systemischen Störung der Volumenregulation. Als Folge einer mit der portalen Hypertension verbundenen reaktiven Vasodilatation im Splanchnikusgebiet besteht die Gefahr einer

systemischen Hypovolämie und Hypotonie, wodurch arterielle Barorezeptoren und kardiopulmonale Volumenrezeptoren stimuliert werden. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und des sympathischen Nervensystems. Dies wiederum führt zu einer verminderten Natrium- und Wasserausscheidung, einer renalen Vasokonstriktion und letztlich zu einer Plasmavolumenexpansion (Wiest und Schölmerich 2006, Bavdekar und Thakur 2016), welche wiederum die Aszitesbildung aufrechterhält. Die Entwicklung von Aszites markiert einen entscheidenden Wendepunkt für Patienten mit Leberzirrhose, da es Ausdruck einer fortschreitenden Lebererkrankung ist und sich Infektionen wie die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ausbilden können. Aus diesem Grund sollte bei jeder Erstmanifestation von klinisch erkennbarem Aszites, sowie bei jeder Verschlechterung immer eine diagnostische Aszitespunktion durchgeführt werden (European Association For The Study Of The Liver 2010).

1.2. Prognose

Die Prognose von Patienten mit Leberzirrhose hängt ganz entscheidend vom Auftreten krankheitsassoziierter Komplikationen ab. Patienten im kompensierten Stadium haben eine mittlere Überlebenszeit von über 12 Jahren, wohingegen eine dekompensierte Zirrhose statistisch innerhalb von 2 Jahren zum Tode führt (Zipprich et al. 2012). In besonders schweren Fällen der Dekompensation mit Versagen weiterer Organsysteme, dem sogenannten akut-auf-chronischen Leberversagen (ACLF), steigt die 3-Monats-Letalität auf bis über 70 % (Moreau et al. 2013). Ein wesentlicher Grund für die zunehmenden Todesraten bei fortschreitender Leberzirrhose ist eine deutliche Zunahme von bakteriellen Infektionen (Arroyo et al. 2015).

1.3. Bakterielle Infektionen und spontan bakterielle Peritonitis

Patienten mit einer Leberzirrhose, die stationär aufgenommen werden, haben in 25 - 35 % der Fälle eine bakterielle Infektion (Jalan et al. 2014). Weitere 34 % entwickeln diese im Verlauf des stationären Aufenthaltes (Arvaniti et al. 2010). Das Risiko für nosokomiale Infektionen ist damit im Vergleich zu 5 - 7 % bei Patienten ohne Zirrhose 4 - 5-fach so hoch (Wong et al. 2005, Jalan et al.

2014). Auch das ACLF wird in über einem Drittel der Fälle durch Infektionen hervorgerufen. Es wird allerdings diskutiert, ob aufgrund der großen Zahl von unklaren Auslösern und der auch in dieser Kohorte häufig erhöhten Inflammationsparameter die tatsächliche Zahl noch wesentlich höher ist (Arroyo et al. 2015). Die Letalität im Rahmen von Infektionen unabhängig von der Schwere der Dekompensation liegt bei 30 % innerhalb eines Monats. Wichtig ist, dass Infektionen auch den langfristigen Verlauf negativ beeinflussen, da die Letalität nach einem Jahr auf 63 % ansteigt (Jalan et al. 2014).

Die häufigste Infektion bei einer Leberzirrhose ist die spontan bakterielle Peritonitis (SBP) (etwa 25 %), gefolgt von Harnwegsinfektionen (20 %), Pneumonie (15 %) und Bakteriämie (12 %) (Tandon und Garcia-Tsao 2008). Die SBP ist eine für Patienten mit Leberzirrhose einzigartige Erkrankung, da sie bei anderen Patienten mit oder ohne Aszites quasi nicht vorkommt (Mal et al. 1991). Die Prävalenz der SBP von stationär aufgenommenen Patienten liegt bei 10 %, wobei die Hälfte der Patienten bereits bei der Krankenhausaufnahme eine SBP-Episode haben und der Rest diese erst während des Krankenhausaufenthaltes entwickelt (European Association For The Study Of The Liver 2010). Definiert ist sie als Infektion der Aszitesflüssigkeit ohne eine viszerale Perforation und ohne eine nachweisbare intraabdominelle Infektionsquelle wie einem Abszess, eine akute Pankreatitis oder eine Cholezystitis (Căruntu und Benea 2006). Die Diagnose der SBP basiert auf dem Nachweis der immunologischen Reaktion durch Bestimmung der Anzahl polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMNs) im Aszites (> 250 PMNs / μ l Aszites) (Wiest et al. 2012, Pericleous et al. 2016). Nach der ursprünglichen Vorstellung treten lebende Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in die mesenterialen Lymphknoten über, was als bakterielle Translokation bezeichnet wird (Berg 1999). Bis zu einem bestimmten Grad ist dies sogar ein physiologisches Phänomen. Bei einer Leberzirrhose kommt es jedoch zu einem pathologischen Anstieg (Wiest et al. 2014, Tilg et al. 2016). Die dabei zugrundeliegenden Pathomechanismen sind:

a) Eine Störung des ökologischen Gleichgewichts der Darmflora (Valadez et al. 2016) durch eine veränderte Keimbeseidlung des Darms. Im Gegensatz zu gesunden Patienten sind hierbei vermehrt gramnegative Bakterien zu finden (Giannelli et al. 2014).

b) Eine reduzierte Darmmotilität (Pericleous et al. 2016) und eine damit verbundene erhöhte intestinale Passagedauer, welche eine bakterielle Überwucherung ermöglicht (Tandon und Garcia-Tsao 2008). Gefördert wird diese zusätzlich durch weitere zirrhotisch bedingte Faktoren wie eine verminderte Magensäureproduktion und eine verminderte Gallensäureproduktion (Valadez et al. 2016).

c) Eine erhöhte intestinale Permeabilität verursacht durch die portale Hypertension (Kalaitzakis 2014) und durch Veränderungen der Tight Junctions mit darauffolgendem Funktionsverlust (Assimakopoulos 2012).

d) Beeinträchtigung des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) durch eine permanente bakterielle Stimulation (Albillos et al. 2014).

Letztlich gelangen Bakterien über die mesenterialen Lymphknoten in den Blutkreislauf und in die Aszitesflüssigkeit (Nieto et al. 2015). In der überwiegenden Anzahl der Fälle wurden daher monomikrobielle Infektionen durch gramnegative Bakterien, gewöhnlich *E. coli*, beobachtet (European Association For The Study Of The Liver 2010). Allerdings können unter optimalen Bedingungen mit den klassischen kulturellen Nachweismethoden nur in durchschnittlich 40 % der SBP-Fälle tatsächlich Erreger kultiviert werden (Engelmann et al. 2016). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass selbst die Bestandteile von Bakterien [PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns)], welche ebenfalls aus dem Darm translozieren, eine Immunreaktion induzieren und somit die häufig „sterilen“ SBPs erklären können (Arroyo et al. 2015).

Durch den Beginn einer antibiotischen Behandlung konnte die Letalität dieser Erkrankung von 90 % in den 1980er Jahren auf mittlerweile 10 - 50 % gesenkt werden (Arvaniti et al. 2010, Gerbes et al. 2011, Pericleous et al. 2016). Bei der nosokomialen SBP liegt die Sterblichkeit allerdings noch immer bei > 50 % (30-Tage-Sterblichkeit), da diese hauptsächlich durch antibiotikaresistente Bakterienstämme verursacht wird (Cheong et al. 2009).

1.4. Immundysfunktion des angeborenen Immunsystems

Ein wesentlicher Grund für diese hohe allgemeine Empfänglichkeit für Infektionen besteht in einer schweren Dysregulation des Immunsystems, die als Folge einer Leberzirrhose auftritt. Diese als Zirrhose-assoziierte Immundysfunktion (CAIDS) bezeichnete Veränderung beinhaltet typischerweise

zwei gegensätzliche Erscheinungsformen: eine systemische Inflammation und eine sich häufig anschließende Immunparalyse. Die systemische Inflammation beginnt bereits im kompensierten Stadium der Leberzirrhose infolge der Stimulation des Immunsystems durch sogenannte „Damage Associated Molecular Patterns“ (DAMPs) (Albillos et al. 2014). Dabei handelt es sich um Proteine [bspw. HMGB1 (High-Mobility-Group-Protein B1)] oder andere Moleküle [bspw. DNA (Desoxyribonukleinsäure), ATP (Adenosintriphosphat)], welche sich unter normalen Bedingungen innerhalb der Zellen befinden (Rubartelli und Lotze 2007). Im Rahmen des hepatischen Schädigungsprozesses gehen Hepatozyten durch Nekrose oder Apoptose unter und setzen DAMPs frei, die wiederum eine sterile systemische Inflammation induzieren (Arroyo et al. 2015). Im dekompenzierten Stadium kommt ein weiterer immunstimulierender Faktor hinzu: die PAMPs. PAMPs sind repetitive Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen, wie die Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran gramnegativer Bakterien (Murphy et al. 2009) und erreichen die Blutbahn über die bakterielle Translokation aus dem Darm (Arroyo et al. 2015). Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen sowohl die DAMPs, als auch die PAMPs über „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs) (Rubartelli und Lotze 2007), zu denen unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die NOD-like Rezeptoren (NLRs) gehören (Jalan et al. 2014). Die Bindung von PAMPs oder DAMPs resultiert entweder in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) oder in einer Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), wodurch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-1 stimuliert wird (Bonnel et al. 2011). Zytokine sind zwar ein wichtiger Bestandteil bei der Immunreaktion, da sie sowohl stimulierende als auch inhibierende Wirkungen haben (Loppnow 2001), die erhöhten Zytokinlevel im Blut bei Patienten mit Leberzirrhose sind jedoch auch in Abwesenheit einer bakteriellen Infektion (Fiuza et al. 2000) vergleichbar mit denen einer Sepsis (Clària et al. 2016). Dies ist zum einen den portosystemischen Shunts zuzuschreiben, welche Blut an der Leber vorbeiführen, wodurch eine adäquate Eliminierung nicht möglich ist (Tandon und Garcia-Tsao 2008). Zum anderen ist die Endotoxin- (bspw. LPS) und Zytokineliminierung durch das retikuloendotheliale System (RES) der Leber

vermindert. Diese mononukleären Zellen sind bei einer Leberzirrhose nicht nur in ihrer Anzahl, sondern auch in ihrer Aktivität reduziert (Jalan et al. 2014). Die Plasmaspiegel von Endotoxin sind daher bei Patienten mit einer dekompensierten Leberzirrhose im Vergleich zu gesunden Patienten und Patienten mit einer kompensierten Zirrhose am höchsten (Abbildung 2).

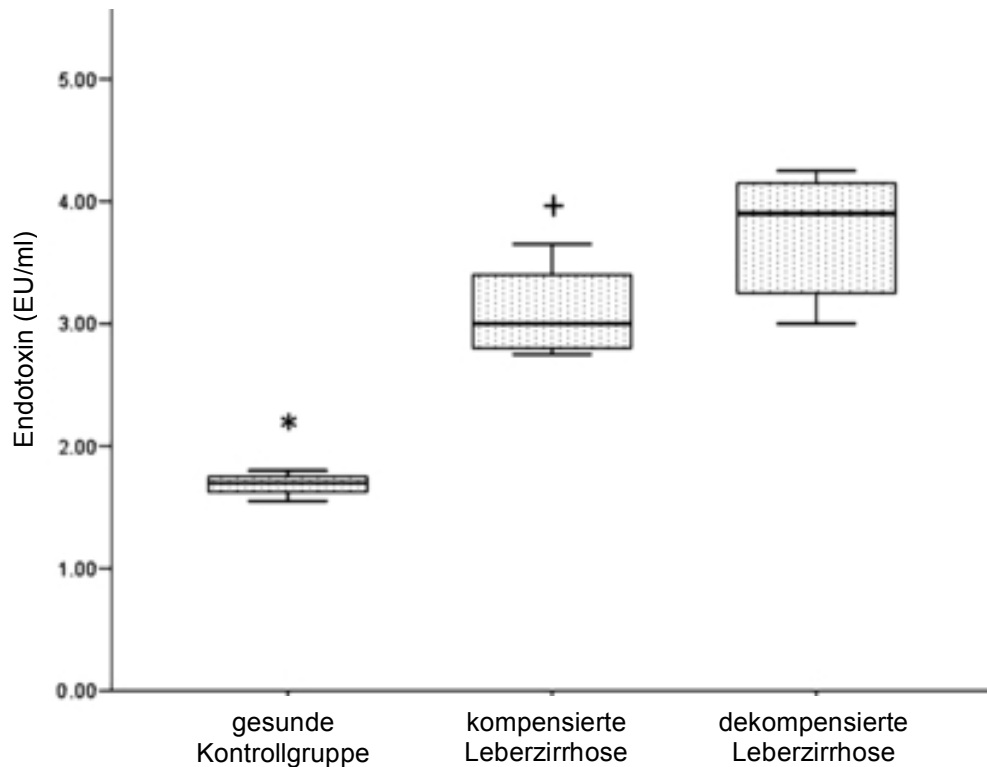


Abbildung 2: Endotoxinkonzentrationen im Plasma bei dekompensierter Leberzirrhose [im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (* p < 0,001), im Vergleich zur kompensierten Leberzirrhose (+ p < 0,05)], modifizierte Darstellung (Assimakopoulos et al. 2012)

Das Verhältnis proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine verschiebt sich infolgedessen ganz wesentlich auf die Seite der Inflammation (Bonnell et al. 2011, Clària et al. 2016). Die permanente Immunstimulation führt letztlich zu einer „Erschöpfung“ insbesondere der phagozytierenden Zellen (Panasiuk et al. 2005) und zu einer Immunparalyse (Jalan et al. 2014). Phagozytierende Zellen, wie Makrophagen und PMNs, haben im gesunden Milieu die Fähigkeit opsonierte oder nicht opsonierte Partikel aufzunehmen (Lee et al. 2003) und diese durch lysosomale Enzyme oder reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) aus dem oxidativen Burst zu zerstören (Murphy et al. 2009). Eine vorhergehende Opsonierung erfolgt durch Komplementfaktoren, welche hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden (Qin und Gao 2006). Sie sind daher bei einer Leberzirrhose nur in einem reduzierten Maß zu finden (Tandon und Garcia-Tsao 2008, Jalan et al. 2014), was zur schlechten Abwehrlage der Patienten mit Leberzirrhose beiträgt.

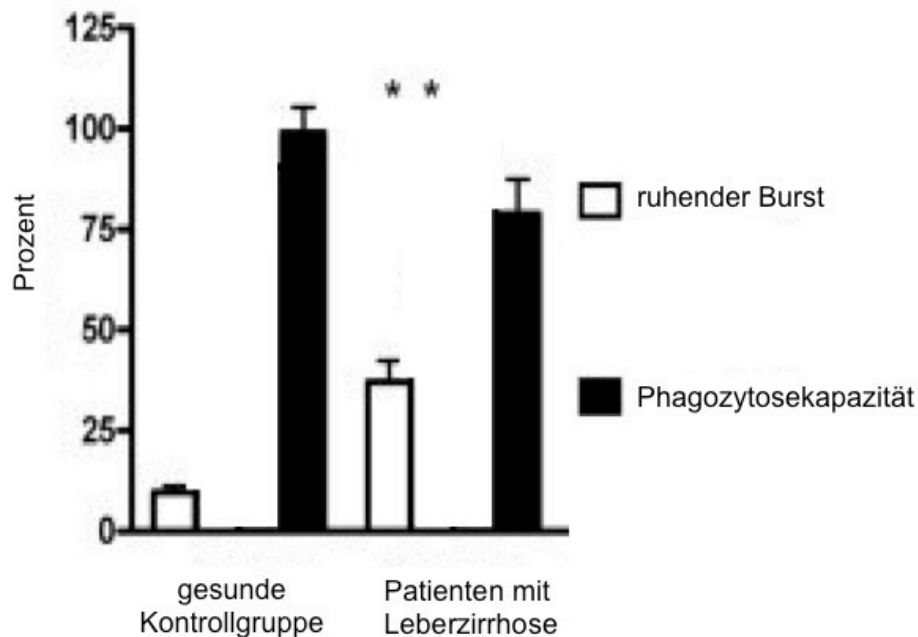


Abbildung 3: Ruhender oxidativer Burst und Phagozytosekapazität bei Patienten mit Leberzirrhose [im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,001$)], modifizierte Darstellung (Mookerjee et al. 2007)**

Die Immunparalyse der PMNs zeigt sich in einer verminderten Fähigkeit zur Phagozytose und einem hohen ruhenden Burst (Abbildung 3) (Tritto et al. 2011, Jalan et al. 2014), welcher mit einem höheren Risiko für eine Infektion verbunden ist. Zwar ist der oxidative Burst einerseits entscheidend für die Immunreaktion, eine inadäquate Produktion freier Sauerstoffradikale kann jedoch zu oxidativem Stress (Lu 2013) und einer Gewebeschädigung führen und die Apoptose anderer Immunzellen induzieren (Stadlbauer et al. 2009, Tritto et al. 2011). Verstärkt wird dies durch ein verringertes Level an Gluthation bei Patienten mit Leberzirrhose, welches unter anderem für die Reduktion der ROS zuständig ist (Townsend et al. 2003). Der hohe Energieverbrauch durch den hohen ruhenden Burst dient außerdem einer

möglichen Erklärung für die verringerte Phagozytosekapazität: Da beide Prozesse energieabhängig sind, fehlt diese dann für die Phagozytose. Zusätzlich wird die Phagozytose negativ beeinflusst durch hohe LPS-Konzentrationen aufgrund der bakteriellen Translokation. LPS aktiviert die PMNs (Mookerjee et al. 2007), welche somit neben ROS auch Elastase bilden können. Elastase hat jedoch einen reduzierenden Einfluss auf die Phagozytose, indem es den Phagozytose-stimulierenden Oponinrezeptor CR1 (Komplementrezeptor 1) spalten kann (Tritto et al. 2011).

Neben dem angeborenen ist auch das adaptive Immunsystem von der Zirrhose-assoziierten Immundysfunktion betroffen. Da dies aber nicht Teil unserer Studie war, soll darauf nicht weiter eingegangen werden.

1.5. Peritoneale Funktion von Immunzellen des angeborenen Immunsystems

Warum gerade der Aszites überproportional häufig als Infektionsort bei Patienten mit Zirrhose betroffen ist und eine SBP bei malignem Aszites eine Rarität darstellt (Lebrun et al. 1992), ist bisher nicht vollständig geklärt. Bisherige Untersuchungen legen jedoch nahe, dass eine gestörte peritoneale Abwehrfunktion eine mögliche Rolle spielt. Das Risiko eine SBP zu entwickeln ist zunächst bei geringen Proteinkonzentrationen im Aszites von $< 10 - 15$ g/l (Fernández et al. 2016) signifikant erhöht. Dieser Parameter ist mit einer geringen Konzentration von Komplementfaktoren gleichzusetzen (Sese et al. 2003), welche essentiell für eine adäquate Oponierfähigkeit und Immunfunktion sind (Murphy et al. 2009). Obwohl Makrophagen im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten bei der Phagozytose nicht so stark auf die vorherige Oponierung angewiesen sind (Maródi et al. 1991), wurden bei peritonealen Makrophagen neben einer verminderten Fähigkeit zur Adhäsion und Antigenpräsentation auch Defekte in der Phagozytose (Nieto et al. 2015) und dem oxidativen Burst (Ahmed et al. 2011) nachgewiesen. Daneben scheint jedoch auch die Funktion der PMNs im Aszites beeinträchtigt zu sein. Lebrun et al. lieferten 1992 erste Hinweise, dass der Aszites von Patienten mit

Leberzirrhose eine hemmende Funktion auch auf diesen Zelltyp haben kann. Dazu wurden diese aus dem Blut gesunder Patienten isoliert und mit dem Aszites von Patienten mit Zirrhose und malignem Aszites in Kontakt gebracht. Zunächst konnte eine Verschlechterung der Funktion der PMNs unter Zugabe von zirrhotisch bedingtem Aszites gezeigt werden. Diese konnte jedoch durch Zugabe von malignem Aszites wieder verbessert werden. In einer Studie von Nieto et al. 2015 wurde die Funktion der PMNs im Aszites von Patienten mit und ohne SBP untersucht. Verglichen mit sterilem Aszites (hier definiert als Anzahl PMNs $< 250/\text{mm}^3$ und negativem Kulturnachweis) wurde im Aszites mit spontan bakterieller Peritonitis ein verringerter oxidativer Burst der PMNs festgestellt.

1.6. Ziel der Studie

Die Ursache der hohen Anfälligkeit für eine SBP bei Leberzirrhose ist daher möglicherweise eine Dysfunktion der Phagozyten, insbesondere der PMNs. Allerdings ist die Fallzahl bisheriger Untersuchungen gering und eine Einschätzung der tatsächlichen zellulären Dysfunktion ist ohne einen Vergleich mit korrespondierenden zirkulierenden PMNs bisher nicht möglich. Wir möchten daher in dieser Studie die Funktionseinschränkung von PMNs im Aszites von Patienten mit Leberzirrhose evaluieren und werden dazu die Fähigkeit zur Phagozytose und stimuliertem oxidativen Burst in Aszites- und korrespondierenden Blutproben untersuchen.

2. Publikation

Titel:	Ascites' neutrophil function is significantly impaired in patients with decompensated cirrhosis but can be restored by autologous plasma incubation
Autoren:	Engelmann C ¹ , Becker C ¹ , Boldt A, Herta T, Boehlig A, Splith K, Schmelzle M, Mueller N, Krohn S, Tautenhahn HM, Bartels M, Sack U, Berg T
Zeitschrift:	Scientific Reports
Publikationsdatum:	05. Dezember 2016
ISSN:	2045-2322 (Electronic), 2045-2322 (Linking)
DOI:	10.1038/srep37926
Pubmed-ID:	27917877
Literaturangaben:	30
Sprache:	Englisch
Impact Faktor:	5.525 (5-year impact factor)
Erscheinungsweise:	kontinuierlich
Begutachtung:	peer-reviewed

¹ geteilte Erstautorenschaft

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Ascites' neutrophil function is significantly impaired in patients with decompensated cirrhosis but can be restored by autologous plasma incubation

Received: 27 May 2016
Accepted: 02 November 2016
Published: 05 December 2016

Cornelius Engelmann^{1,*}, Christina Becker^{1,2,*}, Andreas Boldt², Toni Herta¹, Albrecht Boehlig¹, Katrin Splith³, Moritz Schmelzle³, Niklas Mueller¹, Sandra Krohn¹, Hans-Michael Tautenhahn⁴, Michael Bartels⁴, Ulrich Sack^{2,*} & Thomas Berg^{1,*}

Systemic immune cell dysfunction is a typical feature of liver diseases and increases the risk of bacterial infection, especially spontaneous bacterial peritonitis. We evaluated functional properties of neutrophil granulocytes in blood and ascites of patients both with and without decompensated cirrhosis. We collected blood and ascites samples from 63 patients with cirrhosis and eight without cirrhosis. Phagocytosis activity (PA) and oxidative burst activity (OBA) were evaluated after *ex vivo* stimulation with *E. coli*, while fluorescence signals were measured by flow cytometry. Ascites' neutrophil function tests were repeated after incubation with autologous plasma. Ascites' neutrophils showed an impaired PA and OBA (median blood PA 98.1% (86.8–99.8) vs. ascites' PA 50.5% (0.4–97.3), $p < 0.0001$; median blood OBA 98.7% (27.5–100) vs. ascites' OBA 27.5% (0.3–96.7), $p < 0.0001$). Patients with non-cirrhotic ascites showed higher PA but equally suppressed OBA. Ascites' neutrophil function could be partially restored after incubation with autologous plasma (median increase PA: 22.5% (–49.7 – +93.2), $p = 0.002$; OBA: 22.8% (–10.4 – +48.8), $p = 0.002$). Ascites' neutrophils of patients with cirrhosis are functionally impaired, but could be partially restored after incubation with plasma. Further investigations are needed to identify the factors in ascites that are associated with neutrophils' function.

Patients with end-stage liver diseases typically express features of a dysfunctional immune system that are associated with a suppressed response of peripheral blood neutrophils to invading pathogens^{1–3}. This is considered to be part of a general immune exhaustion induced by the continuous intestinal, bacterial, translocation-mediated immune stimulation in cirrhosis^{4–8}. It is assumed that there is a strong causal relationship between so-called immune paralysis and the high rate of infectious complications in decompensated liver cirrhosis^{9–12}. To date, however, it is unclear why ascites or peritoneal cavities are the predominant site of bacterial infection in patients with decompensated cirrhosis (that is, spontaneous bacterial peritonitis (SBP)), while this type of infection is only rarely seen in patients with malignant ascites^{13,14}.

Studies that specifically address peritoneal host defence mechanisms in decompensated cirrhosis cases are few and far between. The phagocytosis and oxidative burst capacity of peritoneal macrophages has been found to be severely impaired¹⁵, and the level of opsonic activity in ascites has been linked to the risk of developing SBP^{14,15}. Only one study has evaluated functional properties in ascites' neutrophils^{16,17}, by comparing phagocytosis and

¹University Hospital Leipzig; Section of Hepatology; Department of Internal Medicine, Neurology, Dermatology, Liebigstrasse 20, 04103 Leipzig, Germany. ²University Hospital Leipzig; Institute of Clinical Immunology, Johannisalle 30, 04103 Leipzig, Germany. ³Charité - Universitätsmedizin Berlin; Department for General, Visceral and Transplantation Surgery, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. ⁴University Hospital of Leipzig; Department for General, Visceral and Transplantation Surgery, Liebigstrasse 20, 04103 Leipzig. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.E. (email: cornelius.engelmann@medizin.uni-leipzig.de)

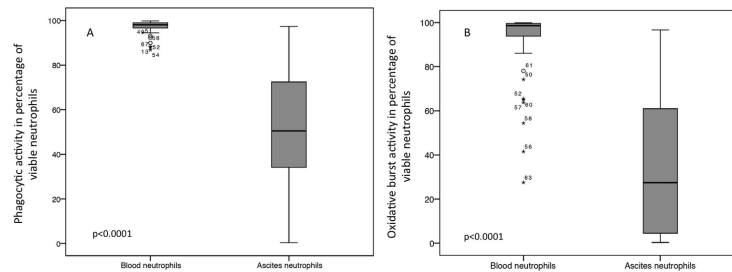


Figure 1. Phagocytic rate (A) and oxidative burst rate (B) of neutrophils in blood and ascites. Boxplots show that neutrophils' function was significantly diminished in ascites' neutrophils, compared to blood neutrophils. Values are given as the percentage of viable neutrophils.

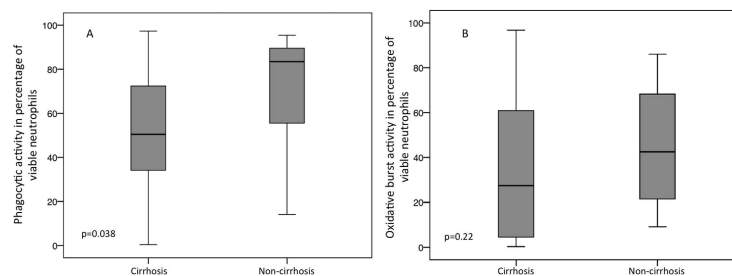


Figure 2. Phagocytic rate (A) and oxidative burst rate (B) of ascites' neutrophils, presented separately for cirrhosis and non-cirrhosis. Boxplots show that phagocytosis activity, but not oxidative burst activity, in ascites' neutrophils was reduced in cirrhosis compared to non-cirrhotic ascites. Values are given as the percentage of viable neutrophils.

oxidative burst activity in patients with and without SBP. However, the function of the peripheral blood neutrophil counterpart was not studied, so it remains a matter of speculation whether the findings in ascites are simply a reflection of the systemic neutrophil dysfunction that has been observed in patients with liver failure.

Due to this lack, we were interested in whether neutrophils in ascites of patients with decompensated cirrhosis show a higher degree of functional impairment, not only compared to their blood counterparts, but also to ascites' neutrophils derived from patients with non-cirrhotic ascites.

Results

Phagocytic and oxidative burst rate of neutrophils derived from patients with cirrhosis. Neutrophil function was determined by flow cytometry after stimulation with inactivated and opsonised *E. coli* bacteria. Phagocytic rate and oxidative burst rate were determined as the percentage of active neutrophils in relation to the total number of viable neutrophils. Phagocytosis could be determined in 62 out of 63 blood samples and in 60 out of 63 ascites samples from patients with cirrhosis. Oxidative burst was measurable in all (63/63) blood samples and in 62 out of 63 ascites samples.

The median ascites' phagocytic rate was 50.5% (range 0.4–97.3), compared to 98.1% (range 86.8–99.8; $p < 0.0001$) in blood neutrophils. The median ascites' oxidative burst rate was 27.5% (range 0.3–96.7), compared to 98.7% (range 27.5–100; $p < 0.0001$) in blood (see Fig. 1). The ascites' neutrophil functions were not correlated with the functioning of blood neutrophils (correlation coefficient for phagocytic rate: $r = 0.213$ ($p = 0.102$), and for oxidative burst rate: $r = 0.165$ ($p = 0.2$)). In addition, the ranges of phagocytic and oxidative burst rates were broader in ascitic fluid than in blood neutrophils, ranging from normal to nearly undetectable rates (see Fig. 1), which possibly indicates that additional environmental factors may be involved in the mechanisms of peritoneal neutrophil stimulation.

Neutrophil function in patients with non-cirrhotic ascites. The median phagocytic rate of neutrophils in non-cirrhotic ascites was 83.5% (range 14.1–95.4), 33% higher than in ascites' neutrophils of patients with cirrhosis ($p = 0.038$) (see Fig. 2). The median ascites' neutrophil oxidative burst rate was 42.5% (range 9.1–86). Although the neutrophils increased by about 15% in cirrhotic ascites, they did not reach statistical significance ($p = 0.22$). The ascites' protein level was the major factor differentiating ascitic fluid in cirrhotic and non-cirrhotic

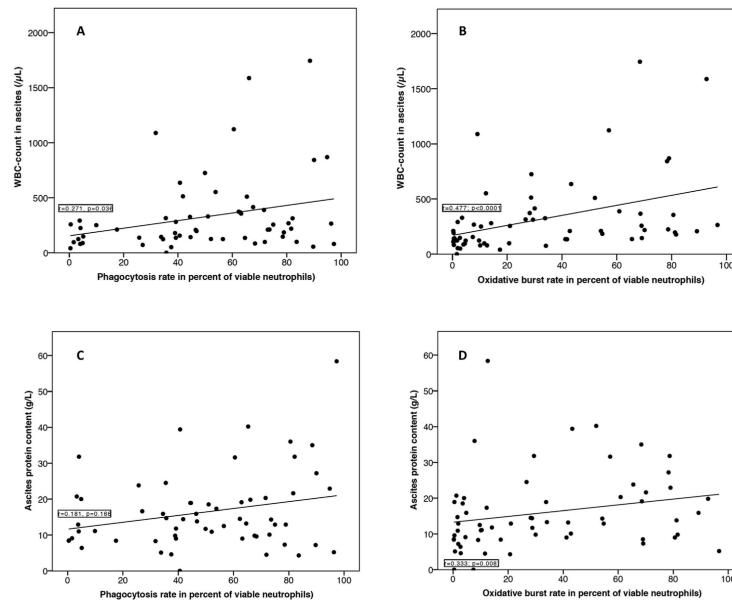


Figure 3. Ascites' neutrophils' functions in patients with cirrhosis in correlation with the ascites' leukocyte count and protein content. Figure (A) shows the correlation between the phagocytic rate and WBC count in ascites; figure (B) between the oxidative burst rate and the WBC count in ascites; figure (C) between the phagocytic rate and ascites' protein content; and figure (D) between the oxidative burst rate and ascites' protein content. For correlation analysis, the Spearman-Rho coefficient was calculated and a correlation coefficient of $r > 0.5$ was considered relevant.

patients, being significantly higher in the latter group (median ascites' protein content in cirrhosis was 13.2 g/L (range 0–58.4) vs. 23.55 g/L (range 21.4–46) in non-cirrhosis, $p = 0.001$).

The blood neutrophils of patients without cirrhosis showed a median phagocytosis rate of 99% (97.2–99.8), 1.8% lower than in the cirrhosis group ($p = 0.049$). The median oxidative burst rate, with a median of 98.5% (62.7–100) was not different in blood neutrophils in cirrhosis (-0.2% , $p = 0.792$) compared to patients with cirrhosis.

Factors associated with ascites' neutrophil function in cirrhosis. We further assessed whether patient characteristics, as well as markers of liver disease severity, correlated with neutrophil function in ascites. Although male patients exhibited higher phagocytosis and oxidative burst activity than their female counterparts, the difference did not reach statistical significance (median phagocytic rates in males was 60.5% (range 3.3–96.3) vs. 35.7% (range 0.4–97.3) in females, $p = 0.065$; median oxidative burst rates in males was 28.8% (range 0.3–96.7) vs. 9.7% (range 0.5–89.2) in females, $p = 0.18$). In addition, for all other parameters, including age, body weight, Child-Pugh score, model of end-stage liver disease (MELD) score, white blood cell count (WBC), C-reactive protein and medical treatment, no clear correlation with the level of ascites' neutrophil function could be found (see Supplementary Table 1, Supplementary Figure 3 and Supplementary Figure 4).

The ascites' leukocyte count showed a weak association with the oxidative burst rate (leukocyte count: $r = 0.477$, $p < 0.0001$) but not with the phagocytic rate ($r = 0.271$; $p = 0.036$) in ascites' neutrophils (see Fig. 3). In patients with cirrhosis and SBP, the median oxidative burst rate was significantly higher than in those without SBP (median 48.1% (9.1–92.7) vs. median 19% (0.3–96.7, $p = 0.014$). Concerning the phagocytosis rate, no significant difference in relation to SBP was observed (SBP: median 62.9% (31.6–94.8) vs. no SBP: median 48.9% (0.4–97.3), $p = 0.150$).

Added to this, the ascites' protein content showed neither an association with the phagocytic rate ($r = 0.181$, $p = 0.166$) nor with the oxidative burst rate ($r = 0.333$, $p = 0.008$) (see Fig. 3).

Factors associated with circulating neutrophil function in cirrhosis. There was no clear correlation between functional properties of blood neutrophils and baseline parameters such as age, body weight, Child-Pugh score, serum protein and albumin (Supplementary Table 2). Although oxidative burst rate showed a negative correlation with the MELD score ($r = -0.278$, $p = 0.028$), WBC ($r = -0.27$, $p = 0.032$) and C-reactive protein ($r = -0.34$, $p = 0.022$) the coefficient did not meet our criteria for a valid correlation (i.e. $r > 0.5$). However, in

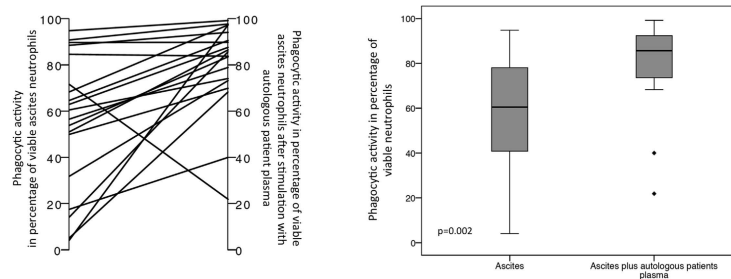


Figure 4. Phagocytic rate of ascites' neutrophils after incubation with autologous plasma. The left plot depicts the individual changes, while the boxplots show the distribution of phagocytic rates of ascites' neutrophils before and after incubation with autologous patients' plasma. Values are given as the percentage of viable neutrophils.

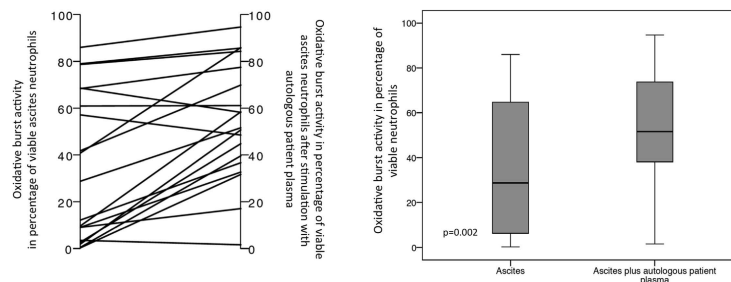


Figure 5. Oxidative burst rate of ascites' neutrophils after incubation with autologous plasma. The left plot portrays the individual changes, while the boxplots present the distribution of oxidative burst rates of ascites' neutrophils before and after incubation with autologous patients' plasma. Values are given as the percentage of viable neutrophils.

patients with more advanced decompensation of liver function defined by a MELD score ≥ 15 or a cirrhosis stage Child-Pugh C the oxidative burst rate was significantly reduced as compared to patients with more preserved liver function (MELD ≥ 15 : median oxidative burst rate 19% (range 0.3–89.2) vs. MELD < 15 : 43.8% (range 0.3–96.7), $p = 0.023$) or Child-Pugh C category (Child C: median oxidative burst rate 9.7% (range 0.3–80.6) vs. Child B: 41% (range 0.3–96.7) vs. Child A: 38.5% (range 2.8–79) $p = 0.026$).

Ascites' neutrophil function was partially restored after incubation with autologous plasma. We artificially modulated environmental conditions for ascites' neutrophils *ex vivo* via incubation with autologous plasma.

Ascites neutrophils' showed a significant net increase in median phagocytic activity, by 22.5% (range –49.7–93.2) (from 60.5% (range 4.1–94.8) to 85.7% (range 21.9–99.2), $p = 0.002$) (see Fig. 4) after said procedure. However, it did not result in a full restoration of phagocytic activity, which was still lower in ascites' neutrophils than in blood neutrophils' median phagocytic rate in the blood (97.4% (range 86.8–99.8, $p < 0.0001$)). Similarly, although oxidative burst activity did increase after *ex vivo* plasma incubation, with a median net increase of 22.8% (range –10.4–48.8) (median oxidative burst rate 28.8% (range 0.3–86) vs. 51.6% (range 1.6–94.7), $p = 0.002$) (see Fig. 5), it also did not reach the activity levels obtained in blood neutrophils (median oxidative burst rate 96% (range 27.5–100), $p = 0.001$).

A total of five patients did not show any response to plasma incubation, but actually presented a worsening of phagocytosis ($n = 2$) and oxidative burst ($n = 3$); only one of these suffered from non-cirrhotic ascites.

Discussion

Immune paralysis in general, and neutrophil dysfunction in particular, are common phenomena in chronic liver diseases and increase the risk of infectious complications¹⁸. SBP is by far the most common bacterial infection in this context. This is in contrast to malignant ascites, where SBP is a rare event¹⁴, possibly indicating differences in the response to invading pathogens. Although it has been suggested that the peritoneal cavity in cirrhosis might

be a privileged site with specifically reduced host defence mechanisms^{19–22}, there have been limited studies evaluating ascites' neutrophil function as a potential contributory factor to the specific susceptibility of the peritoneal cavity to bacterial infections. We therefore evaluated phagocytosis and oxidative burst activity in both ascites and blood neutrophils derived from patients with and without cirrhosis.

In a significant cohort of 63 patients with decompensated cirrhosis, we showed for the first time that, when compared with peripheral blood neutrophils, ascites' neutrophils were severely dysfunctional, showing a reduction of phagocytosis and oxidative burst rates of approximately 50% and 70% respectively. So far, only one study¹⁶ has investigated the functional properties of ascites' neutrophils, looking at 9 and 19 patients with and without SBP. The presence of SBP was associated with lower neutrophil oxidative burst activity, as compared to neutrophils derived from non-infected ascites samples, but activity increased during antibiotic treatment. However, neither the phagocytic rate nor the functional properties of the peripheral blood neutrophils have been studied.

In comparison to previous reports, the functional properties of blood neutrophils in cirrhosis were found to be less depressed in our cohort, which might be, however, partly explained by a relative underrepresentation of patients with heavily impaired liver function^{18,23}. Indeed, we could confirm a significantly reduced blood neutrophils oxidative burst rate when only patients with more advanced decompensation of the liver function (i.e. Child C and MELD ≥ 15) were analysed.

An intriguing finding of our study was the high degree of variability of ascites' neutrophil function, ranging from 0.4% to 97.3% for phagocytosis and from 0.3% to 96.7% for oxidative burst. This result was in contrast to the results obtained from the blood-derived neutrophils, in which the activity rates were more homogeneous, ranging from 86.8% to 99.8% (phagocytosis) and from 27.5% to 100% (oxidative burst). This variability of ascites' neutrophil activity could not be explained by certain patient characteristics, such as liver function, inflammatory parameters or age, although it is known that activation, migration and response to bacteria of circulating neutrophils depends on the degree of liver insufficiency, systemic inflammation and age^{18,24,25}.

We therefore hypothesised that peritoneal cavity- and/or ascite-specific factors must exist, and are responsible for the observed site-specific differences in neutrophil function. Appropriate neutrophil activation is closely regulated by a number of stimulatory, but also inhibitory, factors such as immunoglobulins, complement factors, especially C3b, cytokines (IFN- γ , IL-8, GM-CSF and TNF α) and endotoxin levels^{26,27}. At the time of data acquisition and the *ex vivo* experiments, we were not able to directly measure these factors. However, certain results may indicate the presence or absence of such stimulating or inhibiting factors.

We were able to stratify our results according to the ascites' protein content and leucocyte count as well as the cause of ascites (cirrhotic vs. non-cirrhotic), all of which are well-known predictors of SBP risk^{14,16,22,28}. We found no association between ascites' neutrophil function and their protein content. However, because both tests – phagocytosis and oxidative burst – were performed using pre-opsonised *E. coli* bacteria, factors associated with the opsonic capacity of ascites fluid could not be studied in our test system. In contrast to the phagocytic rate, the leukocyte count in ascites had a weak, yet still significant, impact on the oxidative burst rate, being lower when the leukocyte count was high, thereby confirming the results of Nieto *et al.*¹⁶. The oxidative burst capacity of neutrophils derived from non-cirrhotic ascites was identical to that seen in blood neutrophils, but the phagocytosis rate was reduced by approximately 30%. As blood neutrophil function was maintained in our cohort, and neutrophils adapt to their environment, we hypothesised that the functional properties of ascites' neutrophils may improve upon transferral to patient plasma. Indeed, phagocytosis and oxidative burst rates did recover when ascites' neutrophils were incubated with autologous plasma, showing an increase of about 25% in both function tests. This observation is in line with results previously published by Nieto *et al.*¹⁶, which showed that host defence mechanisms are not irreversibly altered in decompensated liver disease, and that treatment as well as active modification of ambient conditions *in vitro* restores neutrophil function. Lebrun *et al.*²⁹ were the first to show that the functional properties of immune cells can be manipulated by altering their environment. Neutrophils of healthy blood donors were brought into contact with the ascites of patients with cirrhosis (n = 32) and those of patients with malignant diseases (n = 17). Neutrophil function was assessed by chemiluminescence with pre-opsonised zymosan, a strong stimulating signal, in all samples and in four samples from a phagocytosis test using pre-opsonised *Staphylococcus aureus* cells. All functional neutrophil properties were significantly more favourable in samples derived from malignant ascites, as compared to those obtained from ascites of patients with cirrhosis. In addition, it was effectively demonstrated that a disequilibrium between inhibitory and stimulatory signals most likely contributes to the high variability of ascites' neutrophil function. If the ascites of patients with cirrhosis were diluted with saline, their neutrophil function was partially restored. In contrast, when cirrhotic ascites were diluted with their counterparts derived from malignant ascites, their function was significantly improved. It has to be pointed out, however, that there was a lack of direct evidence for environmental factors affecting neutrophil functions. Our results may, however, stimulate further research that would elucidate the functional mechanisms that are potentially involved in neutrophil activation and migration within the micro-milieu of cirrhotic ascites.

In conclusion, this study was able to show, for the first time, that neutrophil function in ascites is severely impaired. This may explain the high susceptibility to spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. The dysfunction of ascites' neutrophils may be partially restored after incubation with autologous plasma. The high functional variability observed in neutrophils derived from ascites suggests that ascites' neutrophil function is dependent on both stimulatory and inhibitory factors. Further studies are needed to clarify the individual factors involved in ascites' neutrophil activity, as these may become potentially interesting targets for SBP treatment and prevention.

Patients and Methods

Study design. Between August 2014 and May 2015, ascites, fluid and corresponding blood samples were consecutively collected from 63 patients with decompensated cirrhosis at the Section of Hepatology, University

Variable	Cirrhosis (n = 63)	Non-cirrhosis (n = 8)	Level of significance (p)
Age (years), mean \pm SD	59.5 \pm 10.3	62.9 \pm 17.4	0.233
Gender (male/female), n (%)	45/18 (71.4%/28.6%)	5/3 (62.5%/37.5%)	0.053
Etiology of cirrhosis, n (%)		Not applicable	
Alcoholic	45 (71.4%)		
NASH	5 (7.9%)		
Cryptogenic	9 (14.3%)		
Others	4 (6.3%)		
Cause of ascites (non-cirrhosis), n (%)	Not applicable		
Malignant		6 (75%)	
Cardiogenic		1 (12.5%)	
Acute BCS		1 (12.5%)	
Bilirubin (μ mol/L), median (range)	29.6 (4–541)	10.4 (3.6–20.9)	0.0001
Albumin (g/L), median (range)	31.9 (13.9–49.5)	33.1 (25.9–54.5)	0.499
INR, median (range)	1.5 (0.9–3.5)	1.1 (0.9–1.53)	0.012
Serum creatinine (μ mol/L), median (range)	106 (41–389)	78 (31–107)	0.018
GFR (ml/min), median (range)	60 (10–119)	67 (51–107)	0.483
Thrombocyte count (exp ⁹ /L), median (range)	86.5 (29–332)	320 (127–474)	0.001
White blood cell count (exp ⁹ /L), median (range)	5.8 (2.9–30.3)	7.05 (2.4–12.6)	0.617
Haemoglobin (mmol/L), median (range)	6.6 (4–9)	6.1 (5.1–7.6)	0.859
C-reactive protein (mg/dL), median (range)	18.9 (1.01–140.31)	16.2 (9.2–125)	0.986
Total protein content blood (g/L), median (range)	63.1 (44.1–78.8)	64 (53.5–64.3)	0.635
Total protein content ascites (g/L), median (range)	13.2 (0–58.4)	23.6 (21.4–46)	0.001
Ascites leukocyte count (/mm ³), median (range)	210 (0–1744)	346.5 (148–2715)	0.036

Table 1. Patient characteristics at baseline paracentesis. Categorical data is displayed as absolute and relative values and metric data as mean \pm standard deviation or median (range), as appropriate. NASH = non-alcoholic steatohepatitis. BCS = Budd-Chiari syndrome. GFR = glomerular filtration rate. INR = international normalised ratio. SD = standard deviation.

Hospital Leipzig, for the purpose of evaluating the ascites' neutrophil function by performing *in vitro* tests for phagocytosis and oxidative burst. Patients with ascites but without cirrhosis (n = 8) served as controls. All patients with ascites, who had been admitted to our hospital, were considered for participation in the study. In line with international clinical practice guidelines²⁹, paracentesis was indicated for new-onset or worsening ascites and in cases where SBP was suspected. Patients with ongoing alcohol abuse, who were receiving immunosuppressive therapy or who were recovering from a liver transplant were excluded from the study. The first paracentesis after enrolment was defined as the baseline for collection of ascites and blood samples. Any subsequent paracenteses were not included in the present analysis. All clinical and laboratory data as obtained exclusively during routine visits not related to the study, was collected retrospectively. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki, and was approved by the ethics committee of the University of Leipzig (No. 182 - 14 - 02062014). All patients gave written informed consent.

Patient characteristics and data collection. The patients' characteristics are summarised in Table 1. Alcohol abuse was the main cause of cirrhosis (71.4%) and malignancies the main reason for ascites (75%) in the non-cirrhosis group. The median MELD score was 16 points (range 6–38), and median Child-Pugh score 9 points (range 5–14), in patients with cirrhosis. After subsequent Child-Pugh classification, the majority of patients with cirrhosis were assigned to Child-Pugh class B (Class A: n = 11 (17.5%); Class B: n = 30 (47.6%); Class C: n = 22 (34.9%)). SBP was diagnosed on the basis of an elevated leukocyte count in ascites (>500/mm³) in 11 out of 63 patients (17.5%) with cirrhosis. At baseline, the following clinical and laboratory data was collected: cause of ascites, etiology of liver cirrhosis, drug history, sex, age, liver and renal function test, platelet count, white blood cell count, serum sodium, haemoglobin, C-reactive protein, serum albumin and protein content. Ascites samples were characterised by their total leukocyte count (via automated cell counter) and their protein content was defined according to institutional standards. SBP was diagnosed in patients with cirrhosis if the ascites' leukocyte count was elevated above 500/mm³³⁰.

Ascites and blood sampling. Ascites samples were collected after careful skin disinfection and under ultrasound guidance. For local anaesthesia, 5–10 mL of Xylocaine (1%) was injected, and afterwards, a 6 French paracentesis cannula (Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding, Germany) was inserted into the peritoneum. An initial fraction of 50 mL of ascitic fluid was used for routine laboratory analysis, while 40 mL of ascitic fluid was obtained for tests related to the study. Venous blood samples were collected under standard aseptic conditions, using a 0.8 mm Multifly-Safety needle (Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht, Germany) immediately after paracentesis, and decanted into heparinised tubes (18 mL) and EDTA tubes (5.7 mL). All ascites and blood samples were processed within four hours after sample collection, under pyrogen-free conditions. For antibody staining, 2 mL of ascitic

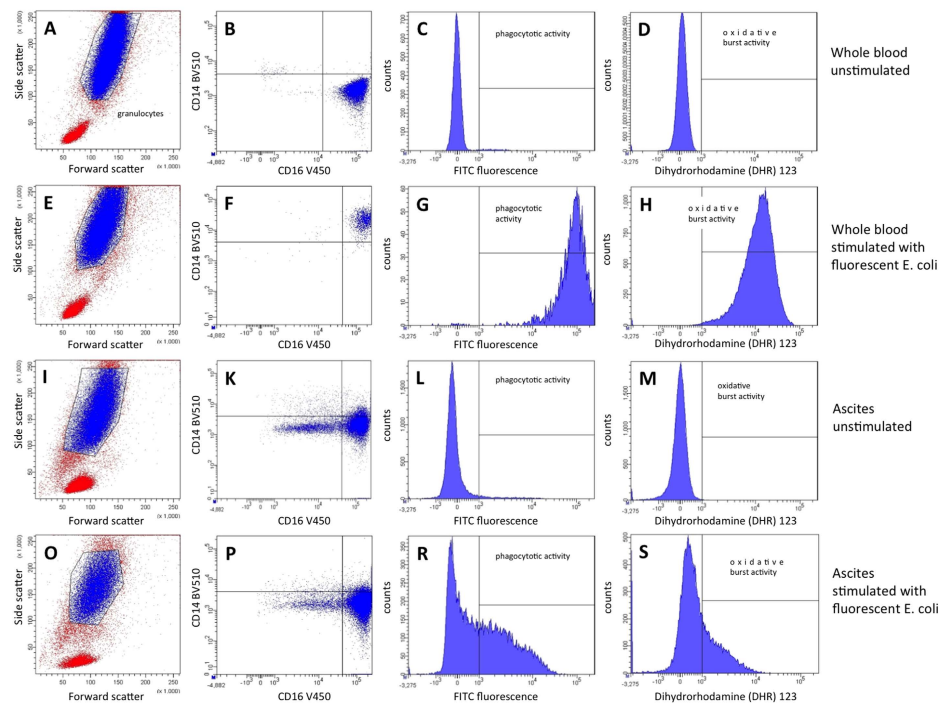


Figure 6. Flow cytometric analyses of phagocytosis and oxidative burst in neutrophils of patients with cirrhosis. Analysis of the neutrophils' granulocyte functions by phagocytosis and oxidative burst in peripheral blood (A–H) and ascites (I–S). Neutrophils' granulocytes were separated from peripheral blood (A,E) and ascites (I,O) by FSC vs. SSC and additionally characterised by surface staining with CD14 BV510 and CD16 V450 with (E,P) and without (B,K) stimulation with fluorescent *E. coli*. In peripheral blood, the expression of CD14 increased after stimulation (F) in contrast to neutrophils' granulocytes in ascites (P), when both were compared to controls without stimulation (B,K). The analysis of phagocytosis and oxidative burst revealed a normal activity in peripheral blood's neutrophils' granulocytes (G,H), in contrast to a strongly attenuated activity in ascites' neutrophils' granulocytes (R,S), when both were compared to controls without stimulation (C,D,L,M). (A–D) Whole unstimulated blood. (E–H) Whole blood stimulated with fluorescent *E. coli*. (I–M) Ascites unstimulated. (O–S) Ascites stimulated with fluorescent *E. coli*.

fluid was poured into Eppendorf tubes (1 mL each). In preparation for flow cytometry and neutrophil function tests, the remaining 38 mL of ascitic fluid was centrifuged in a 50 mL tube at $500 \times g$ for five minutes at room temperature. The neutrophil-containing pellet was re-suspended with 1.5 mL of ascites' supernatant and used for the neutrophil function tests. The remaining ascites; supernatant was stored at -80°C . The heparinised blood was processed for neutrophil function tests without prior preparation. The following steps were the same for blood and ascitic fluid (hereafter referred to as test substances).

Flow cytometry. Each test substance was analysed by flow cytometry using FACS CantoII DiVa software (BD Bioscience, New Jersey, USA), in order to identify neutrophils and perform neutrophil function tests (see Fig. 6). As flow cytometry in ascites is not established, the presence of neutrophils was confirmed by labelling with antibodies against CD14 (BV510; Clone: MfP9; BD Horizon), CD16 (V450; Clone: 3G8; BD Horizon), CD45 (PerCP; Clone: 2D1; BD Bioscience), CD282 (APC; Clone: TL2.1; eBioscience), CD284 (PE-Cy7; Clone: HTA125; eBioscience) and CD62L (APC-Cy7; Clone: DREG-56; BioLegend), antigens that are typically located on neutrophil granulocytes, in the first 26 patients (see Supplementary Figures 1 and 2). In total, 2.5 μL of CD14, 2.5 μL of CD16, 5 μL of CD45, 5 μL of CD282, 5 μL of CD284 and 10 μL of CD62L were added to 100 μL of the test substance and incubated for 15 minutes, while being protected from light, at room temperature. Intact immune cell subtypes were gated and identified by their characteristic forward and sideward scatter. For neutrophil function tests, cell viability could be determined by using propidium iodide, which binds to the DNA of non-viable cells. The latter, as well as artefacts, could be excluded by setting a live gate at the propidium iodide histogram.

Thereafter, flow cytometry for phagocytosis and oxidative burst tests was performed as described in the following section. For the function tests, neutrophils were labelled with CD14 and CD16 antibodies (see Fig. 6).

In vitro neutrophil function tests. Phagocytosis. The phagocytosis test was performed using the Phagotest test kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany), which contains fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled, opsonised and inactivated *E. coli* bacteria; samples were subsequently analysed by flow cytometry (see Fig. 6). In brief, each test substance was poured into two tubes, one for the phagocytosis test (100 μ L) and one for the controls (100 μ L), and cooled on ice for 10 minutes. Thereafter, 20 μ L of Phagotest reagents (*E. coli* bacteria) were added to the test tubes and incubated in a shaking water bath at 37 °C for 10 minutes. The control tube remained on ice. Phagocytosis was stopped after 10 minutes with 100 μ L of quenching suspension. All samples were washed twice in 3 mL of washing solution, before being centrifuged at 500 \times g for 5 minutes. The supernatant was discarded. The remaining pellet was then re-suspended in 2 mL of erythrocyte lysis buffer and subsequently incubated in darkness at room temperature for 20 minutes. After centrifugation at 500 \times g for 5 minutes, the supernatant containing the lysed erythrocytes was again discarded. In order to identify viable neutrophils, the pellet was re-suspended in 200 μ L of DNA staining solution (propidium iodide (PI)). Flow cytometry analysis was performed within one hour. During this period, samples remained on ice in darkness.

Oxidative burst. Phagoburst (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) contains unlabelled, opsonised *E. coli* bacteria and was used to quantify neutrophil oxidative burst (see Fig. 6). For sample preparation, 100 μ L of each test substance was decanted into three tubes for the oxidative burst test, as well as for a negative and positive control. Tubes were cooled on ice for 10 minutes. 20 μ L each of unlabelled, opsonised *E. coli* for the oxidative burst test, a washing buffer for the negative control, and PMA solution (phorbol 12-myristate 13-acetate) for the positive control were added to the respective tubes containing 100 μ L of the test substance, and incubated at 37 °C in a shaking water bath for 10 minutes. Thereafter, 20 μ L of the burst substrate (DHR123) was added to each tube, before they were incubated again at 37 °C in a shaking water bath for 10 minutes. The next steps, consisting of erythrocyte lysis and DNA staining, corresponded to the phagocytosis test and were described previously.

In vitro neutrophil function test after incubation with autologous plasma. We hypothesised that environmental factors play a major role with respect to neutrophil function in ascitic fluid. Accordingly, we modified the environmental conditions *in vitro* and subsequently repeated the neutrophil function tests in the last 19 patients (cirrhotic ascites $n = 16$, non-cirrhotic ascites $n = 3$). For this purpose, patients' ascites' neutrophils were incubated with autologous plasma. Heparinised blood was centrifuged at 2000 \times g at room temperature for 5 minutes. 300 μ L of the resulting plasma (supernatant) was mixed with 300 μ L of the re-suspended ascites pellet. Following this, the phagocytosis and oxidative burst tests were performed as previously described.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 22 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Categorical variables were displayed as percentages or frequencies, and continuous variables as mean \pm standard deviation or median and range, as appropriate. A two-sided p -value of < 0.05 was considered statistically significant. Comparison of unpaired samples was performed by Mann-Whitney U test in the case of continuous data and by Chi-square test for discrete data. Paired samples were compared by Wilcoxon signed rank test. For correlation analysis, the Spearman-Rho coefficient was calculated and a correlation coefficient of $r > 0.5$ was considered relevant.

References

- Wasmuth, H. E. *et al.* Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol* **42**(2), 195–201 (2005).
- Jalan, R. *et al.* Acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* **57**(6), 1336–48 (2012).
- Babior, B. M. Phagocytosis and oxidative stress. *Am J Med* **109**(1), 35–44 (2000).
- Sriskandan, S. & Altmann, D. M. The immunology of sepsis. *J Pathol* **214**(2), 211–23 (2008).
- Tritto, G., Bechlis, Z. & Stadlbauer, V. Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol* **55**(3), 574–81 (2011).
- Malik, R., Mookerjee, R. P. & Jalan, R. Infection and inflammation in liver failure: two sides of the same coin. *J Hepatol* **51**(3), 426–9 (2009).
- Rajkovic, I. A. & Williams, R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatol* **6**(2), 252–62 (1986).
- Bruns, T., Peter, J., Hagel, S., Herrmann, A. & Stallmach, A. The augmented neutrophil respiratory burst in response to *Escherichia coli* is reduced in liver cirrhosis during infection. *Clin Exp Immunol* **163**(3), 346–56 (2011).
- Arvaniti, V. *et al.* Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterol* **139**(4), 1246–56 (2010).
- Wiest, R., Krag, A. & Gerbes, A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut* **61**(2), 297–310 (2012).
- Obstein, K. L., Campbell, M. S., Reddy, K. R. & Yang, Y. X. Association between model of end-stage liver disease and spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* **102**(12), 2732–6 (2007).
- Taylor, N. J. *et al.* The severity of circulating neutrophil dysfunction in patients with cirrhosis is associated with 90-day and 1-year mortality. *Aliment Pharmacol Ther* **40**(6), 705–15 (2014).
- Wiest, R., Lawson, M. & Geuking, M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* **60**(1), 197–209 (2014).
- Mal, F. *et al.* Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid. A study in 47 patients with cirrhosis or malignant peritonitis. *J Hepatol* **12**(1), 45–9 (1991).
- Ahmed, A. M. *et al.* Peritoneal macrophages from patients with cirrhotic ascites show impaired phagocytosis and vigorous respiratory burst. *Results Immunol* **1**(1), 53–9 (2011).
- Andreu, M. *et al.* Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascites. *Gastroenterol* **104**(4), 1133–8 (1993).
- Nieto, J. C. *et al.* Impaired innate immune response of leukocytes from ascites fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis. *J Leukoc Biol* **98**(5), 819–25 (2015).

18. Gabele, E. *et al.* Analysis of monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphism in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol* **15**(44), 5558–62 (2009)
19. Joyce, L. D., Hau, T., Hoffmann, R., Simmons, R. L. & Lillehei, R. C. Evaluation of the mechanism of zymosan-induced resistance to experimental peritonitis. *Surgery* **83**(6), 717–25 (1978)
20. Ruynon, B. A., Morrissey, R. L., Hoefs, J. C. & Wyle, F. A. Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important mechanism against spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* **5**(4), 634–7 (1985)
21. Such, J. *et al.* Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* **6**(1), 80–4 (1988)
22. Taylor, N. J. *et al.* Circulating neutrophil dysfunction in acute liver failure. *Hepatology* **57**, 1142–52 (2013)
23. Leber, B., Mayrhauser, U., Rybczynski, M. & Stadlbauer, V. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver failure. *Wien Klin Wochenschr* **121**, 732–44 (2009)
24. Mookerjee, R. P. *et al.* Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts outcome. *Hepatology* **46**(3), 831–40 (2007)
25. Holland, S. M. & Gallin, J. I. Disorders of granulocytes and monocytes in *Harrison's Principles of internal medicine*. 18th edition, McGraw Hill Education: Columbus, USA, p472–483 (2012).
26. Yajima, M., Yajima, T. & Kuwata, T. Intraperitoneal injection of lactoferrin ameliorates severe albumin extravasation and neutrophilia in LPS-induced inflammation in neonatal rats. *Biomed Res* **26**(6), 249–55 (2005)
27. Kurtz, R. C. & Bronzo, R. L. Does spontaneous bacterial peritonitis occur in malignant ascites? *Am J Gastroenterol* **77**(3), 146–8 (1982).
28. Lebrun, L., Pelletier, G., Briantais, M. J., Galanaud, P. & Etienne, J. P. Impaired function of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol* **16**, 98–101 (1992)
29. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and the hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* **53**(3), 397–417 (2010)
30. Wong, C. L., Holroyed-Leduc, J., Thorpe, K. E. & Straus, S. E. Does this patient have bacterial peritonitis or portal hypertension? How do I perform a paracentesis and analyze the results? *JAMA* **299**, 1166–1178 (2008)

Acknowledgements

We wish to thank the medical and technical staff of the University Hospital Leipzig, Hepatology Section, who made the sample collection and processing possible.

Author Contributions

Cornelius Engelmann: study concept and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, drafting of manuscript, statistical analysis. Christina Becker: acquisition of data, analysis and interpretation of data, technical support, drafting of manuscript, statistical analysis. Andreas Boldt: acquisition of data, analysis and interpretation of data, technical support. Toni Herta: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Albrecht Boehlig: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Katrin Splith: analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content, technical support. Moritz Schmelzle: analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content, technical support. Niklas Mueller: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Sandra Krohn: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Hans-Michael Tautenhahn: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Michael Bartels: acquisition of data, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content. Ulrich Sack: study concept and design, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content, administration, study supervision, procurement of funding, material support. Thomas Berg: study concept and design, analysis and interpretation of data, critical revision of the manuscript for important intellectual content, administration, study supervision, procurement of funding, material support. The work presented in this paper was made possible by institutional funding.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Engelmann, C. *et al.* Ascites' neutrophil function is significantly impaired in patients with decompensated cirrhosis but can be restored by autologous plasma incubation. *Sci. Rep.* **6**, 37926; doi: 10.1038/srep37926 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



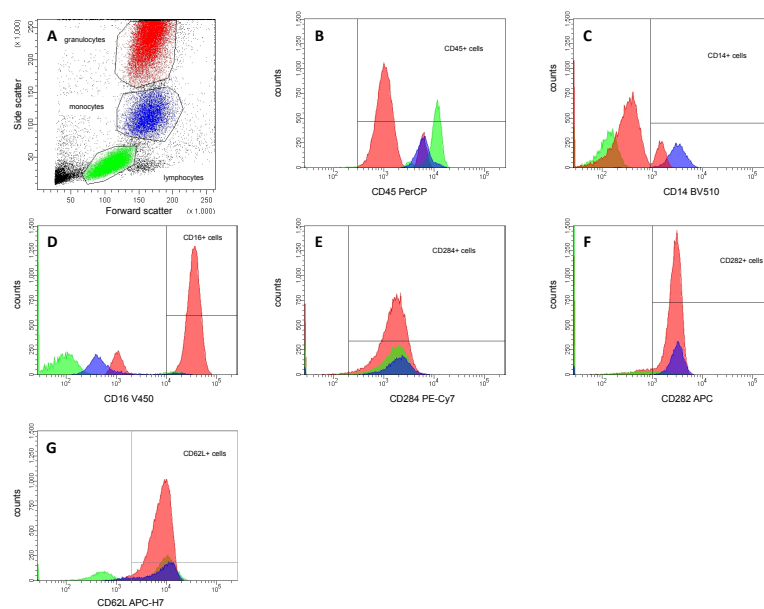
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Material

Figures

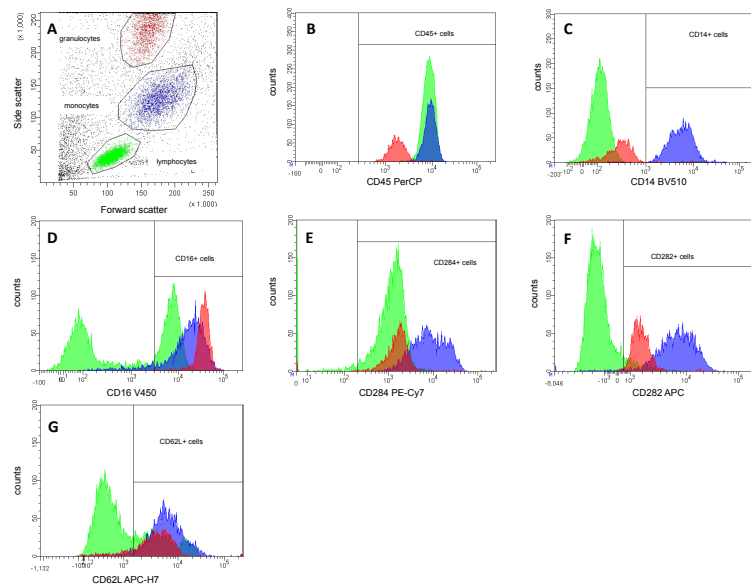
Supplementary Figure 1:



Exemplary flow cytometric characterization of granulocytes (A, red color) in peripheral blood by surface markers typically located on granulocytes: CD45 (B), CD14 (C, only on activated granulocytes), CD16 (D), CD284 (E), CD282 (F) and CD62L (G). Especially staining with CD14 (C) and CD16 (D) can be used to differentiate granulocytes from lymphocytes (A, green color) and monocytes (A, blue color).

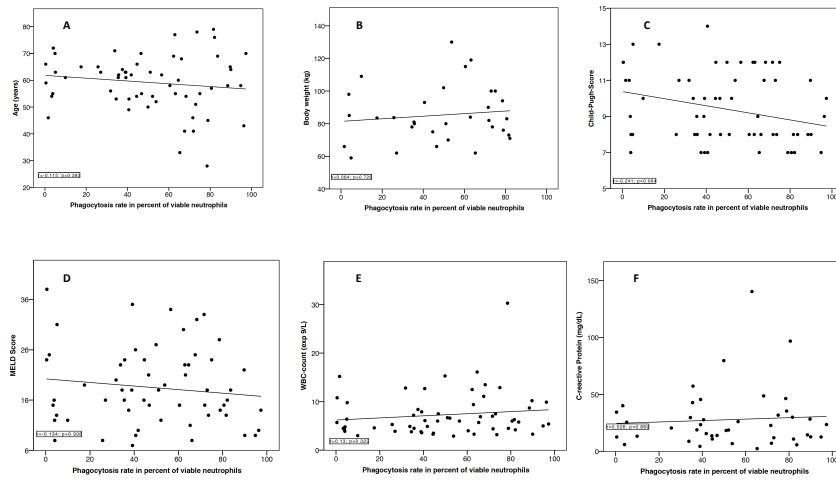
7

Supplementary Figure 2:



Exemplary flow cytometric characterization of granulocytes (A, red color) in ascites by surface markers typically located on granulocytes: CD45 (B), CD14 (C, only on activated granulocytes), CD16 (D), CD284 (E), CD282 (F) and CD62L (G). Especially staining with CD14 (C) and CD16 (D) can be used to differentiate granulocytes from lymphocytes (A, green color) and monocytes (A, blue color).

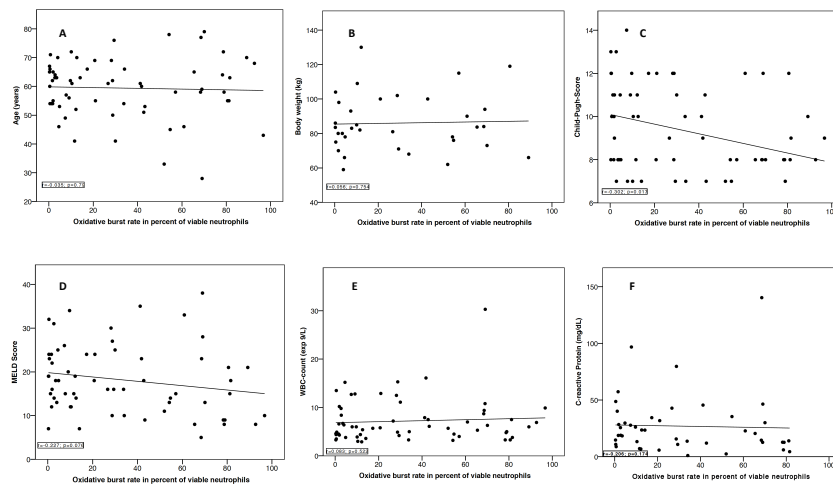
Supplementary Figure 3:



Correlation between phagocytic rate in ascites neutrophils and systemic factors: A) age, B) body weight, C) Child-Pugh-Score, D) MELD, E) WBC count, F) CrP.

A

Supplementary Figure 4:



Correlation between oxidative burst rate in ascites neutrophils and systemic factors:

A) age, B) body weight, C) Child-Pugh-Score, D) MELD, E) WBC count, F) CrP.

c

Tables

Supplementary Table 1: Influence of drugs on the phagocytic rate and oxidative burst rate of ascites neutrophils

Drug	Phagocytic rate (%) median (range)	Level of significance (p)	Oxidative burst rate (%) median (range)	Level of significance (p)
Proton pump inhibitors (administration vs. no administration)	46.5 (0.4-97.3) vs. 52.1 (0.5-94.8)	0.824	17.3 (0.3-96.7) vs. 28.7 (0.5-81.6)	0.33
Antibiotic prophylaxis (administration vs. no administration)	38.2 (0.4-78.9) vs. 55.15 (0.5-97.3)	0.117	11.1 (0.3-98.2) vs. 28.45 (0.3-96.7)	0.614
Beta blocker (administration vs. no administration)	51 (0.4-90) vs. 49.9 (0.5-97.3)	0.948	11 (0.3-92.7) vs. 31.6 (0.4-96.7)	0.065
Diuretics (administration vs. no administration)	43.1 (0.4-96.3) vs. 58.5 (0.5-97.3)	0.233	15.7 (0.3-96.7) vs. 28.5 (0.5-89.2)	0.291
Lactulose (administration vs. no administration)	44.5 (0.4-78.5) vs. 55.15 (0.5-97.3)	0.14	14.1 (0.3-89.2) vs. 29.4 (0.3-96.7)	0.249
Human albumin (administration vs. no administration)	46.5 (0.4-96.3) vs. 53.8 (0.5-97.3)	0.574	23.9 (0.3-96.7) vs. 35 (0.4-81.2)	0.773

Supplementary Table 2: Correlation between phagocytic rate and oxidative burst rate of blood neutrophils and systemic factors.

Factor	Phagocytic rate (r)	Level of significance (p)	Oxidative burst rate (r)	Level of significance (p)
Age (years)	0.032	0.808	-0.028	0.829
Body weight (kg)	0.217	0.217	-0.32	0.061
Child-Pugh score	-0.057	0.659	-0.102	0.428
MELD score	-0.225	0.079	-0.278	0.028
WBC (exp9/L)	-0.185	0.149	-0.27	0.032
CrP (mg/dL)	-0.057	0.714	-0.34	0.022
Serum protein (mg/L)	0.076	0.699	0.036	0.856
Serum albumin (g/L)	0.094	0.468	-0.149	0.253

WBC – White blood cell count

CrP - C-reactive protein

3. Zusammenfassung der Arbeit

Kumulative Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.

Die Funktion neutrophiler Granulozyten im Aszites von Patienten mit
dekompensierter Leberzirrhose ist signifikant vermindert, jedoch reversibel nach
Inkubation mit autologem Patientenplasma

eingereicht von
Christina Becker

angefertigt an der
Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig,
am Institut für Klinische Immunologie und der Klinik für Gastroenterologie und
Rheumatologie, Sektion Hepatologie

betreut von
Herrn Professor Dr. med. Ulrich Sack
Herrn Professor Dr. med. Thomas Berg

mitbetreut von
Herrn Dr. med. Cornelius Engelmann

Monat und Jahr der Einreichung
März 2017

Patienten mit einer dekompensierten Leberzirrhose besitzen ein hohes Risiko
bakterielle Infektionen zu entwickeln. Besonders häufig kommt es dabei zu
einer spontan bakteriellen Peritonitis, wobei die Letalität bis heute noch immer
bei bis zu 50 % liegt. Ein wesentlicher Grund für das generelle Infektionsrisiko
besteht in der Zirrhose-assoziierten systemischen Immunparalyse als Folge
einer andauernden Immunstimulation. Es ist allerdings ungeklärt warum bei

Patienten mit Leberzirrhose die SBP die häufigste Infektion ist, wohingegen Patienten mit malignem Aszites dafür nicht empfänglich sind. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Funktionseinschränkung von PMNs im Aszites von Patienten mit Leberzirrhose zu evaluieren und dafür die Fähigkeit zur Phagozytose und stimuliertem oxidativen Burst in Aszites- und korrespondierenden Blutproben zu untersuchen.

Von insgesamt 71 Patienten mit Aszites, darunter 63 mit einer dekompensierten Zirrhose und 8 mit Aszites ohne eine zugrundeliegende Zirrhose (Kontrollgruppe), wurden Aszites- und Blutproben gesammelt. Die Evaluierung der Neutrophilenfunktion *in vitro* umfasste die durchflusszytometrische Messung der Phagozytose und des oxidativen Bursts beider Proben nach vorheriger Stimulation mit opsonierten E. coli Bakterien aus dem entsprechenden Testkit. Außerdem wurden die Aszites-Neutrophile der letzten 19 Patienten (zirrhotischer Aszites n = 16, nicht-zirrhotischer Aszites n = 3) mit autologem Plasma inkubiert und die Funktionstests wiederholt, um somit den Einfluss von Umgebungsfaktoren zu untersuchen.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software SPSS 22. Ein zweiseitiger p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Der Vergleich ungepaarter Stichproben wurde im Falle kontinuierlicher Daten mit dem Mann-Whitney U Test durchgeführt, bei diskreten Daten wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Der Vergleich gepaarter Stichproben erfolgte mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests. Außerdem wurde eine Korrelationsanalyse unter Kalkulation des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ausgeführt, wobei ein Korrelationskoeffizient von $r > 0,5$ als signifikant galt.

Verglichen mit den entsprechenden Blut-PMNs zeigten die PMNs aus dem Aszites eine deutliche Funktionseinschränkung in der Phagozytose und dem oxidativen Burst. Im Vergleich zu anderen Studien stellten wir kaum eine Funktionseinschränkung der PMNs des Blutes fest. Dies mag der Patientenkohorte geschuldet sein, da Patienten mit starker Leberfunktionsstörung (MELD-Score > 15 und/oder Child-Pugh Klasse C) geringer vertreten waren. Bei isolierter Betrachtung dieser Patienten konnte

hingegen ein signifikant verminderter oxidativer Burst verzeichnet werden. Interessanterweise war die Spannweite der Phagozytose und des oxidativen Bursts der Aszites-PMNs viel größer als die Spannweite der Blut-PMNs. Obwohl bekannt ist, dass die Funktion der PMNs von dem Stadium der Leberinsuffizienz, dem systemischen Inflammationsgrad und dem Alter abhängt, ergab sich kein Zusammenhang dieser Faktoren mit der Spannweite im Aszites. Dies führte uns zu der Hypothese, dass es im Peritoneum spezielle Faktoren geben muss, die für die ortsspezifischen Unterschiede im Blut und Aszites verantwortlich sind.

Da die Aszitesursache (zirrhotisch oder nicht-zirrhotisch), der Proteingehalt und die Leukozytenzahl im Aszites bekannte Prädiktoren für das Risiko einer SBP sind, analysierten wir unsere Ergebnisse auch dahingehend. Dabei zeigten die PMNs von Patienten mit nicht-zirrhotisch bedingtem Aszites eine höhere Phagozytoserate als PMNs von Patienten mit zirrhotisch bedingtem Aszites. Die beiden Gruppen (zirrhotischer und nicht-zirrhotischer Aszites) unterschieden sich außerdem deutlich hinsichtlich des Proteingehalts in der Aszitesflüssigkeit, welcher auch hier signifikant höher in der nicht-zirrhotischen Patientengruppe war. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Proteingehalt im Aszites und der Funktion der PMNs konnte jedoch nicht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Anzahl der Leukozyten im Aszites einen geringen aber dennoch signifikanten Einfluss auf die PMN-Funktion im Aszites, wobei der oxidative Burst bei einer hohen Leukozytenzahl vermindert war.

Da die Funktion der PMNs im Blut nicht vermindert war und diese Immunzellen sich an ihre Umgebung anpassen können, vermuteten wir, dass sich die Funktion der Aszites-PMNs nach *in vitro* Inkubation mit autologem Patientenplasma verbessern könnte. Tatsächlich verbesserten sich sowohl die Phagozytose, als auch der oxidative Burst durch diese Umgebungsveränderung.

Mit dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Funktion von PMNs im Aszites verglichen mit den dazugehörigen PMNs im Blut deutlich vermindert ist. Dies könnte eine Erklärung der hohen Anfälligkeit für eine SBP bei Patienten mit Leberzirrhose sein. Die Funktionsverbesserung nach Inkubation mit autologem Patientenplasma zeigt jedoch, dass dies kein irreversibel veränderter Zustand ist. Zudem lässt die große Spanne der

Ergebnisse von den Funktionstests der PMNs im Aszites darauf schließen, dass die Funktion sowohl von stimulierenden als auch von inhibierenden Faktoren abhängig ist. In weiteren Studien müssen diese genauer definiert werden, da dies insbesondere für die Prävention und Behandlung einer SBP von Interesse sein könnte.

4. Literaturverzeichnis

Ahmed AM, Bomford A, Nouri-Aria KT, Davies T, Smith R, Williams R (2011). Peritoneal macrophages from patients with cirrhotic ascites show impaired phagocytosis and vigorous respiratory burst. *Results Immunol*, 1(1):53-59.

Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M (2014). Cirrhosis-associated immune dysfunction: distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*, 61(6):1385-1396.

Annamalai A, Wisdom L, Herada M, Nourredin M, Ayoub W, Sundaram V, Klein A, Nissen N (2016). Management of refractory ascites in cirrhosis: Are we out of date? *World J Hepatol*, 8(28):1182-1193.

Arroyo V, Moreau R, Jalan R, Ginès P, EASL-CLIF Consortium CANONIC Study (2015). Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome that will re-classify cirrhosis. *J Hepatol*, 62(1 Suppl):S131-143.

Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK (2010). Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology*, 139(4):1246-1256.

Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, Karatza E, Triantos C, Vagianos CE, Spiliopoulou I, Kaltezioti V, Charonis A, Nikolopoulou VN, Scopa CD, Thomopoulos KC (2012). Altered intestinal tight junctions' expression in patients with liver cirrhosis: a pathogenetic mechanism of intestinal hyperpermeability. *Eur J Clin Invest*, 42(4):439-446.

Bataller, R, Brenner DA (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115(2):209-218.

Bavdekar A, Thakur N (2016). Ascites in Children. *Indian J Pediatr*, 83(11):1334-1340.

Berg RD (1999). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol*, 473:11-30.

Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR (2011). Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 9(9):727-738.

Căruntu FA, Benea L (2006). Spontaneous bacterial peritonitis: pathogenesis, diagnosis, treatment. *J Gastrointest Liver Dis*, 15(1):51-56.

Cheong HS, Kang CI, Lee JA, Moon SY, Joung MK, Chung DR, Koh KC, Lee NY, Song JH, Peck KR (2009). Clinical significance and outcome of nosocomial acquisition of spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis*, 48(9):1230-1236.

Clària J, Arroyo V, Moreau R (2016). The Acute-on-Chronic Liver Failure Syndrome, or When the Innate Immune System Goes Astray. *J Immunol*, 197(10):3755-3761.

Engelmann C, Krohn S, Prywerek D, Hartmann J, Herber A, Boehlig A, Zeller K, Boehm S, Berg T (2016). Detection of molecular bacterascites in decompensated cirrhosis defines a risk with decreased survival. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 28(11):1285-1292.

European Association for the Study of the Liver (2010). EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol*, 53(3):397-417.

Fernández J, Tandon P, Mensa J, Garcia-Tsao G (2016). Antibiotic prophylaxis in cirrhosis: Good and bad. *Hepatology*, 63(6):2019-2031.

Fiuza C, Salcedo M, Clemente G, Tellado JM (2000). In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *Journal of Infectious Diseases*, 182(2):526-533.

Gerbes, AL, Gülberg V, Sauerbruch T, Wiest R, Appenrodt B, Bahr MJ, Dollinger MM, Rössle M, Schepke M (2011). S3-Leitlinie „Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom“. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 49(06), 749-779.

Giannelli V, Di Gregorio V, Lebba V, Giusto M, Schippa S, Merli M, Thalheimer U (2014). Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(45):16795-16810.

Gifford FJ, Morling JR, Fallowfield JA (2017). Systematic review with metaanalysis: vasoactive drugs for the treatment of hepatorenal syndrome type 1. *Aliment Pharmacol Ther*, 45(5):593-603.

Jalan R, Fernández J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, Stadlbauer V, Gustot T, Bernardi M, Canton R, Albillos A, Lammert F, Wilmer A, Mookerjee R, Vila J, Garcia-Martinez R, Wendon J, Such J, Cordoba J, Sanyal A, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Burroughs A, Ginès P (2014). Bacterial infections in cirrhosis: a position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol*, 60(6):1310-1324.

Kalaitzakis E (2014). Gastrointestinal dysfunction in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20(40):14686-14695.

Lebrun L, Pelletier G, Briantais MJ, Galanaud P, Etienne JP (1992). Impaired functions of normal peripheral polymorphonuclear leukocytes in cirrhotic ascitic fluid. *J Hepatol*, 16(1-2):98-101.

Lee WL, Harrison RE, Grinstein S (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14):1299-1306.

- Loppnow, H (2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Der Internist*, 42(1):13-27.
- Lu SC (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5):3143-3153.
- Mal F, Huu TP, Bendahou M, Trinchet JC, Garnier M, Hakim J, Beaugrand M (1991). Chemoattractant and opsonic activity in ascitic fluid: a study in 47 patients with cirrhosis or malignant peritonitis. *J Hepatol*, 12(1):45-49.
- Maródi L, Korchak HM, Johnston RB Jr (1991). Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, 146(8):2783-2789.
- Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, Jalan R (2007). Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology*, 46(3):831-40.
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V; CANONIC Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium (2013). Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology*, 144(7):1426-1437.
- Murphy K, Travers P, Walport M (2009). *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag, S. 66, S. 72-73, S. 82, S. 96-97.
- Nieto JC, Sánchez E, Romero C, Román E, Poca M, Guarner C, Juárez C, Soriano G, Vidal S (2015). Impaired innate immune response of leukocytes from ascitic fluid of patients with spontaneous bacterial peritonitis. *J Leukoc Biol*, 98(5):819-825.
- Panasiuk A, Wysocka J, Maciorkowska E, Panasiuk B, Prokopowicz D, Zak J, Radomski K (2005). Phagocytic and oxidative burst activity of neutrophils in the end stage of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 11(48):7661-7665.
- Pericleous M, Sarnowski A, Moore A, Fijten R, Zaman M (2016). The clinical management of abdominal ascites, spontaneous bacterial peritonitis and hepatorenal syndrome: a review of current guidelines and recommendations. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 28(3):e10-e18.
- Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M (2011). Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(2):281-290.
- Qin X, Gao B (2006). The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol*, 3(5):333-340.

Rubartelli A, Lotze MT (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, 28(10):429-436.

Schuppan D, Afdhal NH (2008). Liver cirrhosis. *Lancet*, 371(9615):838-851.

Sese E, Xiol X, Castellote J, Rodríguez-Fariñas E, Tremosa G (2003). Low complement levels and opsonic activity in hepatic hydrothorax: its relationship with spontaneous bacterial empyema. *J Clin Gastroenterol*, 36(1), 75-77.

Stadlbauer V, Mookerjee RP, Wright GA, Davies NA, Jürgens G, Hallström S, Jalan R (2009). Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(1):G15-G22.

Tandon P, Garcia-Tsao G (2008). Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis*, 28(1):26-42.

Terai S, Tsuchiya A (2017). Status of and candidates for cell therapy in liver cirrhosis: overcoming the "point of no return" in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol*, 52(2):129-140.

Tetangco EP, Silva R, Lerma E (2016). Portal hypertension: Etiology, evaluation, and management. *Dis Mon*, 62(12):411-426.

Tilg H, Cani PD, Mayer EA (2016). Gut microbiome and liver diseases. *Gut*, 65:2035-2044.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3):145-155.

Tritto G, Bechlis Z, Stadlbauer V, Davies N, Francés R, Shah N, Mookerjee RP, Such J, Jalan R (2011). Evidence of neutrophil functional defect despite inflammation in stable cirrhosis. *J Hepatol*, 55(3):574-581.

Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014). Liver cirrhosis. *Lancet*, 383(9930):1749-1761.

Valadez JMA, Rivera-Espinosa L, Méndez-Guerrero O, Chávez-Pacheco JL, Juárez IG, Torre A (2016). Intestinal permeability in a patient with liver cirrhosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 12:1729-1748.

Wiegand J, Berg T (2013). The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int*, 110(6), 85-91.

Wiest R, Krag A, Gerbes A (2012). Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut*, 61(2):297-310.

Wiest R, Lawson M, Geuking M (2014). Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*, 60(1):197-209.

Wiest R, Schölmerich J (2006). Diagnostik und Therapie des Aszites. *Deutsches Ärzteblatt.*, Jg. 103, Heft 28–29: A1972-1980.

Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, Patch D, Soriano G, Hoefs J, Navasa M; International Ascites Club (2005). Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the international ascites club. *Gut*, 54:718–725.

Zipprich A, Garcia-Tsao G, Rogowski S, Fleig WE, Seufferlein T, Dollinger MM (2012). Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int*, 32(9):1407-1414.

Darstellung des eigenen Beitrags

Diese Dissertation wurde in Form einer Publikationspromotion verfasst. Bei dieser der Dissertationsschrift zugrundeliegenden Publikation habe ich eine geteilte Erstautorenschaft gemeinsam mit Dr. Cornelius Engelmann. Da es sich um ein interdisziplinäres Projekt unter Beteiligung der Klinischen Immunologie und der Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie (Sektion Hepatologie) handelt, soll mein Beitrag im Folgenden dargestellt werden:

- Aktive Beteiligung am Entwurf des Studienprotokolls sowie weiterer Studienunterlagen (Aufklärung, Einverständniserklärung, Patienteninformation)
- Maßgebliche Beteiligung an der Verfassung des Ethikantrags
- Selbstständige Erstellung einer Patientendatenbank der am Universitätsklinikum Leipzig im Rahmen der Studie punktierten Patienten
- Selbstständige Durchführung der Labortests Phagozytose und oxidativer Burst einschließlich der durchflusszytometrischen Messung
- Datendokumentation, -auswertung und -interpretation
- Statistische Auswertung und Ergebnisinterpretation gemeinsam mit Dr. Cornelius Engelmann
- Erstellung des Gesamtmanuskripts in Zusammenarbeit mit Dr. Cornelius Engelmann und den weiteren Ko-Autoren.
- Mitgestaltung des Posters für den amerikanischen Kongress der American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2015

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Posterbeitrag mit Auszeichnung auf dem amerikanischen Kongress der American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2015:

Engelmann C & Becker C et al. Ascites neutrophil dysfunction in patients with decompensated cirrhosis is linked to ascites protein content. *Hepatology* 2015; Abstract #261

Danksagung

Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit bei Herrn Professor Dr. Ulrich Sack und Herrn Professor Dr. Thomas Berg.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Cornelius Engelmann für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, die vielen hilfreichen Hinweise und das kritische Gegenlesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Boldt, Frau Heike Knaack, Frau Katrin Bauer und Frau Dr. Franka Kahlenberg aus dem Labor der klinischen Immunologie und Transfusionsmedizin bedanken, die mich tatkräftig und sehr geduldig unterstützten.

Allen Studienteilnehmern danke ich für ihre Mithilfe, ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden danke ich herzlich für die Unterstützung in all meinem Vorhaben und die mir entgegengebrachte Geduld.

Anlagen

Unterzeichnete Erklärungen über den wissenschaftlichen Beitrag des Promovenden folgender Mitautoren:

- 1 Dr. Cornelius Engelmann (korrespondierender Autor)
Professor Dr. Ulrich Sack
Professor Dr. Thomas Berg
- 2 Dr. Andreas Boldt
- 3 Toni Herta
- 4 Dr. Albrecht Böhlig
- 5 Dr. Niklas Müller
- 6 Dipl.-Biol. Sandra Krohn
- 7 Professor Dr. Michael Bartels.