

Alina Sophia Ritter

Inhibition of the Hypoxia-inducible factor as therapeutic approach to reduce postoperative peritoneal adhesions

Fach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin Schneider

Postoperative adhesions are the most common postoperative complication, developing in up to 90% of patients undergoing abdominal-pelvic surgery, and may result in bowel-obstruction or infertility. Despite their clinical and surgical relevance, no reliable means to prevent their development have been established yet. Tissue hypoxia, emerging from inevitable blood vessel damage during an operation and increased oxygen-consumption of infiltrating inflammatory cells, is a key component in the pathophysiology of adhesion formation. On a molecular level, reduced oxygen tension leads to stabilization of the hypoxia-inducible factor (HIF), a heterodimeric transcription factor, orchestrating adaption processes such as increased angiogenesis or anaerobic energy production. Various small molecules target the HIF pathway through different mechanisms, e.g. YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazole) by inhibiting HIF's transcriptional activity.

The main goal of this thesis was to determine in a preclinical mouse model whether YC-1 as prototype small molecule inhibitor of HIF could reduce postoperative adhesion formation and in a second step, to unravel the underlying therapeutic mechanism by analysis of murine specimens and *in vitro* studies with macrophages and fibroblasts.

Pretreatment and single intraoperative treatment with YC-1 highly significantly reduced postoperative adhesion development on postoperative day 7. Simultaneously, adhesions quality was altered, to a less tense, stable and vascularized phenotype upon YC-1 treatment. Extent of hypoxia in adhesion tissue did not differ between control and intervention group, implying that the observed difference was due to an altered peritoneal response. At the same time, no overt side effects or wound healing deficits were observable. Blood analysis showed neither acute hepato- and nephrotoxicity nor suppression of erythropoiesis.

Histological evaluation of adhesion tissue, revealed, that the inflammatory response in YC-1-treated animals, quantified by a reduced number of CD45⁺-leucocytes and F4/80⁺-macrophages respectively, was significantly ameliorated. Consistently, abundance of cytokines, associated with a pro-inflammatory M1-polarization of macrophages were reduced in adhesion tissue and peritoneal lavage fluid. Simultaneously, immunomodulatory M2-markers were unaffected or increased implying a M1-M2-switch of macrophages. *In vitro* lipopolysaccharide (LPS) stimulation and YC-1 treatment of J774.A1 cells and bone marrow-derived macrophages under normoxia and hypoxia resulted in a significant decrease of pro-inflammatory, M1-markers as well as impaired. This was accompanied by a decrease of active HIF-1 α under hypoxia and LPS-stimulation by YC-1, which, however, did not affect corresponding HIF-2 α levels.

Cooperatively with macrophages, activated, contractile fibroblasts, so called myofibroblasts, contribute to postoperative adhesion formation. In YC-1 treated animals number of alpha smooth muscle actin (α SMA)-positive cells was decreased. Accordingly, local collagen deposition in the adhesion core was mitigated. Two sources for the origin of myofibroblasts

have been described: epithelial-mesenchymal-transition (EMT) of mesothelial cells as well as activation of residential fibroblasts. Abundance of EMT-inductors in adhesion tissue and lavage was decreased upon YC-1 administration. Likewise, YC-1 treatment reduced the expression of α SMA in peritoneal fibroblasts deprived of oxygen *in vitro*. Concurrently, hypoxia-dependent upregulation of markers characterizing the so-called “adhesion-phenotype” of peritoneal fibroblasts, including Transforming growth factor- β , Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and Vascular endothelial growth factor, was mitigated by YC-1 treatment *in vitro*. Active HIF-1 α levels were reduced by YC-1 without affecting HIF-2 α abundance. A transient, siRNA-mediated knockdown of HIF-1 α and HIF-2 α in NIH-3T3 embryonic fibroblasts confirmed that the alterations of adhesion-fostering genes were indeed HIF-1 α , but not HIF-2 α dependent.

The *in vitro* observed reduction of PAI-1, the main endogenous inhibitor of tissue Plasminogen activator (tPA) and thus, fibrinolysis, was likewise present *in vivo*: PAI-1 levels in peritoneal lavage fluid were significantly decreased, resulting in enhanced tPA-activity in YC-1-treated animals. Similarly, angiogenesis, knowingly driven in a HIF-dependent fashion, was suppressed by YC-1 treatment *in vivo*, resulting in fewer blood vessels in adhesion tissue.

Thus, by cooperatively inhibiting various putatively HIF-1 α -dependent pathways, YC-1 treatment results in the amelioration of postoperative peritoneal adhesion development without causing overt side effects or wound healing deficits in a preclinical mouse model. However, more preclinical studies concerning optimization of the application protocol and revealing pharmacological properties of YC-1 or other potentially effective HIF-1 α -inhibitors are needed to further exploit this mechanism for the prevention of postoperative adhesions.

Alina Sophia Ritter

Inhibition of the Hypoxia-inducible factor as therapeutic approach to reduce postoperative peritoneal adhesions

Fach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin Schneider

Postoperative Adhäsionen stellen die häufigste postoperative Komplikation dar, da sie in bis zu 90% aller abdominell operierten Patienten entstehen. Sie können mögliche Langzeitfolgen wie einen Bridenileus oder Unfruchtbarkeit verursachen. Trotz dieser hohen klinischen Relevanz und der resultierenden gesundheitsökonomischen Bedeutung ist bis heute kein verlässliches Verfahren zur Verhinderung der Adhäsionsbildung in der allgemeinchirurgischen Routine etabliert. Pathophysiologisch spielt der Sauerstoffmangel im Operationsgebiet eine tragende Rolle indem er ihre Entstehung fördert. Ursächlich für diese Minderversorgung ist einerseits die unvermeidbare Schädigung von Blutgefäßen bei operativen Eingriffen, sowie andererseits der erhöhte Sauerstoffverbrauch reaktiv-infiltrierender Entzündungszellen. Dabei führt die Hypoxie auf molekularbiologischer Ebene zu einer Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF), einem heterodimeren Transkriptionsfaktor, der Anpassungsprozesse, wie Angiogenese oder anaerobe Energieproduktion, moduliert. Verschiedene Moleküle interagieren mit dem HIF-Signalweg über verschiedene Mechanismen, darunter YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazole), welches HIFs transkriptionelle Aktivität inhibiert.

Das Hauptziel dieser Promotionsarbeit war es festzustellen, inwiefern sich YC-1 als Prototyp für einen HIF-Inhibitor dazu eignet, in einem präklinischen Mausmodell die Bildung postoperativer Adhäsionen zu reduzieren, und in einem weiteren Schritt, den zugrundeliegenden therapeutischen Mechanismus durch Analysen der Gewebeproben und durch Zellkulturversuche mit Makrophagen und Fibroblasten aufzudecken.

Zunächst zeigte sich, dass YC-1 die Entstehung peritonealer Adhäsionen am 7. postoperativen Tag sowohl durch Vor- und Nachbehandlung als auch durch eine einzige intraoperative Injektion im Mausmodell hochsignifikant senken konnte. Zugleich veränderte sich die Qualität der gebildeten Verwachsungen, welche weniger dicht, stabil und vaskularisiert waren. Dabei unterschied sich das Ausmaß der Gewebshypoxie zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe nicht, was auf eine veränderte peritoneale Reaktion hindeutet. Im Rahmen einer Analyse möglicher Nebenwirkungen zeigte sich weder eine akute Hepato- noch Nephrotoxizität oder eine Repression der Erythropoese. Zudem traten keine Wundheilungsstörungen auf.

In den histologischen Untersuchungen des Adhäsionsgewebes wurde offensichtlich, dass die Entzündungsreaktion der YC-1-behandelten Tiere abgeschwächt war. Dabei war sowohl die Zahl der in die Adhäsion infiltrierenden CD45⁺-Leukozyten als auch der F4/80⁺-Makrophagen signifikant reduziert. Dazu passend waren Zytokine, welche dem Sekretionsprofil von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen zugeordnet werden können, in der Peritonealflüssigkeit und im Adhäsionsgewebe am vermindert nachweisbar. Zugleich zeigten sich immunmodulatorische M2-Marker unverändert oder erhöht. *In vitro*-Behandlung der Makrophagenzelllinie J774.A1 sowie primären Makrophagen aus murinem Knochenmark mit

YC-1 und Lipopolysacchariden (LPS) unter Normoxie bzw. Hypoxie führte ebenfalls zu einer verminderten Expression von klassischen M1-Markern sowie zu einer verminderten Phagozytoseaktivität. Dies konnte auf eine Verminderung von HIF-1 α , jedoch nicht HIF-2 α durch YC-1 unter hypoxischen und inflammatorischen Bedingungen zurückgeführt werden.

Neben Makrophagen spielen bei der Entstehung postoperativer Adhäsionen auch aktivierte, kontraktile Fibroblasten, so genannte Myofibroblasten, eine tragende Rolle. In YC-1-behandelten Tieren war die Bildung von Myofibroblasten eingeschränkt, was sich in der verringerten Anzahl von alpha smooth muscle actin (α SMA) -positiven Zellen zeigte. Folglich war auch die lokale Kollagenablagerung im nekrotischen Adhäsionszentrum reduziert. Zwei verschiedene Ursprünge für Myofibroblasten sind bekannt: Zum einen können Mesothelzellen aktiviert werden und transdifferenzieren (so genannte Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)), andererseits können gewebständige Fibroblasten zu Myofibroblasten aktiviert werden. Die EMT-vermittelnden Wachstums- und Transkriptionsfaktoren waren nach YC-1-Behandlung vermindert nachweisbar. Darüber hinaus verringerte die YC-1-Behandlung von peritonealen Fibroblasten in der Zellkultur die Expression von α SMA und von Genen, die den so genannten „Adhäsionsphänotyp“ der peritonealen Fibroblasten charakterisieren. Hierzu zählen unter anderem der Transforming growth factor β , der Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) und der Vascular endothelial growth factor (VEGF). Dabei reduzierte YC-1 das aktive HIF-1 α ohne das aktive HIF-2 α zu verändern. Außerdem konnte mittels eines siRNA-vermittelten Knockdown von HIF-1 α und HIF-2 α in NIH-3T3 embryonalen Fibroblasten gezeigt werden, dass die hypoxische Induktion von adhäsionsfördernden Genen ausschließlich HIF-1 α und nicht von HIF-2 α abhängt.

Die *in vitro* beobachtete verminderte Expression von PAI-1, dem wichtigsten endogenen Inhibitor des tissue Plasminogen activators und damit der Fibrinolyse, zeigte sich ebenfalls *in vivo*: Die Konzentration von PAI-1 in der Peritonealflüssigkeit von YC-1-behandelten Tieren war vermindert. Ähnlich war auch die HIF-regulierte Angiogenese durch YC-1-Behandlung abgeschwächt. So war die Blutgefäßdichte in den Adhäsionen von YC-1-behandelten Tieren verringert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass YC-1 durch die gleichzeitige Inhibition verschiedener scheinbar HIF-1 α -regulierten Signalwege eine Verringerung der postoperativen Adhäsionsbildung im Mausmodell bewirkt. Systemische Nebenwirkungen oder Wundheilungsstörungen waren dabei nicht offenkundig. Dennoch sind weiter präklinische Studien zur Optimierung des Anwendungsprotokolls und den pharmakologischen Eigenschaften von YC-1 oder anderen gegebenenfalls geeigneten HIF-1 α -Inhibitoren nötig, bevor dieser Mechanismus für die Prävention von postoperativen Adhäsionen im Menschen ausgenutzt werden kann.