

Marvin Lucas Biller

Dr. med.

Preclinical evaluation of pharmacological Hypoxia-inducible-factor-inhibitors during postoperative peritoneal adhesion formation

Fach/Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Martin Schneider

Postoperative peritoneale Adhäsionen gelten als eine der häufigsten Komplikationen nach viszeralchirurgischen Eingriffen und stellen eine große Last sowohl für Patienten als auch das Gesundheitssystem dar. Bis heute wurden zahlreiche erfolglose Versuche unternommen, ein geeignetes Präventionsmittel mit klinischer Eignung zu finden. Mehrere Studien zeigen dabei die zentrale Rolle von Sauerstoffmangelzuständen und der darauffolgenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α für die pathologischen Mechanismen, die der peritonealen Adhäsionsbildung zugrunde liegen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung von HIF-1 α mit YC-1 peritoneale Adhäsionsbildung sowohl in vivo als auch in vitro mildern kann.

Das Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob klinisch etablierte Medikamente mit der Fähigkeit zur Hemmung von HIF-1 α , darunter Metformin und Amphotericin B, postoperative peritoneale Adhäsionsbildung in vivo und in vitro verringern können. Darüber hinaus sollte auch untersucht werden, ob peritoneales Adhäsionsgewebe menschlicher Herkunft eine erhöhte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 α sowie seiner nachgeschalteten Gene zeigt.

Mit Bezug auf Metformin hat sich dabei ergeben, dass nach Anwendung des Medikaments die postoperative Adhäsionsbildung in einem Mausmodell mit „ischemic buttons“ sowohl quantitativ als auch qualitativ deutlich abgenommen hat. Dieser Effekt wurde durch perioperatives Absetzen nur marginal schwächer, was den Sinn hatte zu zeigen, dass der klinische Standard des Absetzens von Metformin 48 Stunden vor einer OP den Effekt nicht eliminiert. Darüber hinaus wurden murine Fibroblasten und humane Mesothelzellen mit dem Ziel inkubiert, die zugrundeliegenden molekularen Prozesse besser zu verstehen. Es konnte gezeigt werden, dass der Hypoxie-induzierte Anstieg von VEGF mRNA durch Metformin partiell umkehrbar ist. Ebenfalls hat eine immunhistochemische Färbung des in vivo gewonnenen Gewebes für CD31+ Endothelzellen gezeigt, dass eine Behandlung mit Metformin die Angiogenese hemmt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Transkription des antifibrinolytischen Proteins PAI-1 durch Metformin in vitro deutlich vermindert wurde. Mit Blick auf Entzündungsreaktionen wurde demonstriert, dass sich durch Anwendung des Medikaments die Häufigkeit von CD45+ Leukozyten in dem murinen Adhäsionsgewebe vermindert werden konnte. Interessanterweise haben die Auswertungen auch ergeben, dass weder in vivo noch in vitro ein Effekt von Metformin auf Phagozytose sowie Makrophagenpolarisation und nachweisbar ist. Die Rekrutierung von Makrophagen wurde durch Metformin geringfügig vermindert. Weitere histologische Aufarbeitungen und Transkriptionsanalysen haben außerdem ergeben, dass Metformin die HIF-1 α -vermittelten Prozesse EMT, Myofibroblastenaktivierung und Fibrose in vivo und in vitro abmildert. Dazu kommt, dass tiefere Analysen von Metformins Wirkungsweise eine reduzierte Transkriptionsaktivität von HIF1 α im murinen Adhäsionsgewebe nach Erhalt des Medikaments gezeigt haben. Durch Western-Blot konnte darüber hinaus auch ein reduziertes Proteinlevel von HIF-1 α unter Sauerstoffmangel und gleichzeitiger Metformingabe in

murinen Fibroblasten dargestellt werden. Abschließend haben Experimente mit denselben Zellen bezüglich des mitochondrialen Komplex I gezeigt, dass Metformin die ATP Konzentration unter hypoxischen Bedingung erhöht. Damit ergibt sich, dass das Medikament die Proteinlevel von HIF-1 α vermutlich nicht über ein erhöhtes intrazelluläres Sauerstoffniveau als Resultat einer gehemmten Atmungskette erniedrigt.

Obwohl viele Fragen bezüglich der Spezifität des Effekts von Metformin auf HIF-1 α , der optimalen Dosis und der Beteiligung von anderen molekularen Signalwegen offenbleiben, hat diese Arbeit gezeigt, dass Metformin einen starken anti-adhäsiven Effekt in Patienten haben könnte. Angesichts des guten Sicherheitsprofils, der geringen Nebenwirkungen und der langjährigen klinischen Verwendung als Routinemedikament scheinen weiterführende Studien über das Potenzial von Metformin gegen postoperative peritoneale Adhäsionsbildung sinnvoll.

Mit Blick auf Amphotericin B haben vergleichbare in vivo Mausexperimente mit „ischemic-buttons“ weder einen qualitativ noch einen quantitativ messbaren Effekt des Medikaments gezeigt. Darüber hinaus haben vergleichbare in vitro Analysen über die zugrundeliegenden Pathomechanismen keinen Effekt auf Gefäßneubildung und die Entzündungsreaktion gezeigt. Sowohl murine als auch humane Zellen haben jedoch auf eine Behandlung mit Amphotericin B mit einer partiellen Umkehr des Hypoxieinduzierten Anstiegs von PAI-1 mRNA reagiert. Im Gegenzug stieg die Transkription von TGF- β , einem der Hauptvermittler von EMT und Gewebefibrose, unter O₂-Mangel und simultaner Amphotericin B Behandlung jedoch an. Abschließend haben Experimente mit murinen AML-12 Hepatozyten gezeigt, dass Amphotericin B zwar nicht die Proteinlevel von HIF-1 α reduziert, dafür jedoch seine Transkriptionsaktivität beeinflusst, indem es die transkriptionelle Expression von HIF-1 α Zielgenen verändert.

Zusammengefasst haben die Experimente gezeigt, dass Amphotericin B HIF-1 α nicht in einer linearen und spezifischen Art und Weise hemmt. Darüber hinaus implizieren die Ergebnisse, dass das Medikament auch noch andere, bisher nicht identifizierte und für peritoneale Adhäsionsbildung relevante molekulare Signalwege beeinflusst. Dies fügt sich in die Ergebnisse der in vivo und in vitro Experimente ein, die keinen überzeugenden anti-adhäsiven Effekt von Amphotericin B nachweisen konnten. Abschließend ist das klinische Einsetzungspotenzial von Amphotericin B gegen postoperative peritoneale Adhäsionsbildung, auch angesichts seiner multiplen Nebenwirkungen, als begrenzt einzuschätzen und bedarf weiterer Untersuchung.

Zuletzt hat die Analyse von Adhäsionsgewebe aus Relaparotomie-Patienten ergeben, dass die Transkriptionsaktivität von HIF-1 α in diesem erhöht ist. Weitere Analysen mit dem Gewebe haben darüber hinaus gezeigt, dass zahlreiche HIF-1 α nachgeschaltete Gene sowie die dadurch regulierten pathologischen Prozesse ebenfalls hochreguliert sind. Obwohl nachfolgende Arbeiten zu dem Thema nötig sind, konnte diese Studie HIF-1 α s Rolle als einer der wichtigsten molekularen Akteure im Rahmen der postoperativen peritonealen Adhäsionsbildung im Menschen bestätigen. Demzufolge stellt die pharmakologische Hemmung von HIF-1 α einen vielversprechenden zukünftigen therapeutischen Ansatz im klinischen Rahmen dar.