

Aus der Klinik für Urologie

Universität zu Lübeck

(Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham)

**Untersuchungen zum Einsatz von integrinblockierenden
Oligopeptiden zur Inhibition von intraperitonealen Adhäsionen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Caroline Elisa Blietz

aus Bremen

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Böhle
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Birth

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.02.2007

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Einleitung	
1.1 Vorbemerkung	8
1.2 Peritoneale Adhäsionen	8
1.2.1 Definition	8
1.2.2 Historische Entwicklung	9
1.2.3 Epidemiologie	10
1.2.4 Ätiologie und Risikofaktoren	11
1.2.5 Pathophysiologie	12
1.2.6 Therapie	14
1.3 Zelladhäsion	15
1.3.1 Adhäsionsmoleküle	15
1.3.2 Extrazellulärmatrix	16
1.3.3 Fibronektin	17
1.3.4 Kollagen	19
1.3.5 Laminin	20
1.3.6 Integrinrezeptoren	20
1.3.7 Funktion der Integrinrezeptoren	21
1.3.8 Spezifität der Integrinrezeptoren	23
1.3.9 Integrinspezifische Oligopeptide	25
1.3.10 Modifizierte Oligopeptide	27
1.4 Problem- und Aufgabenstellung	28
1.4.1 Adhäsionsinhibition in vitro	28
1.4.2 Reduktion peritonealer Adhäsionen nach Serosaläsion in vivo	28

II Material und Methoden

2.1	Zellen	29
2.1.1	Fibroblasten und Zellkultur	29
2.1.2	Zellzahlbestimmung	29
2.1.3	Kryokonservierung/Auftauen von Zellen	30
2.2	Zelladhäsionsassay	30
2.2.1	Spezifische Oligopeptide	31
2.2.2	Modifizierte Oligopeptide	31
2.2.3	Angiotensin	31
2.2.4	Phospholipid	32
2.2.5	Zelladhäsionsassay	32
2.3	Peritoneale Adhäsion	35
2.3.1	Versuchstiere	35
2.3.2	Anästhesie	35
2.3.3	Rasur und Desinfektion	36
2.3.4	Laparotomie	37
2.3.5	Setzen der peritonealen Adhäsion	38
2.3.6	Bauchspülung und Applikation von Testsubstanzen	39
2.3.7	Einteilung der Versuchsansätze	39
2.3.8	Wundverschluss	40
2.3.9	Opferung der Mäuse	40
2.3.10	Sektion	40
2.4	Statistik	41

III Ergebnisse

3.1	Adhäsionsinhibition in vitro	42
3.1.1	Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Fibronectin	42
3.1.2	Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Mischmatrix durch Oligopeptide	44
3.1.3	Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Mischmatrix durch Phospholipid	45
3.1.4	Adhäsionsinhibition durch kombinierte Oligopeptide	47
3.1.5	Zusammenfassung Adhäsionsinhibition in vitro	50
3.2	Minimierung peritonealer Adhäsionen nach Serosaschädigung	51
3.2.1	Adhäsionsinhibition in vivo	51
3.2.2	Adhäsionsinhibition Oligopeptidspülung	52
3.2.3	Adhäsionsinhibition Phospholipidspülung	53
3.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Adhäsionsinhibition in vivo	54

IV Diskussion

4.1	Literaturübersicht	57
4.1.1	Postoperative peritoneale Adhäsionen	57
4.1.2	Einsatz spezifischer integrinblockierender Oligopeptide	59
4.2	Adhäsionsinhibition in vitro	61
4.3	Adhäsionsinhibition in vivo	63
4.4	Schlussfolgerung	65

V	Zusammenfassung	67
VI	Literaturverzeichnis	69
VII	Anhang	79
VIII	Abkürzungen	83
IX	Danksagung	84
X	Lebenslauf	85
XI	Publikationen	87

Meinen Eltern

I Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Die Adhäsion von Zellen unterschiedlichen Ursprungs werden durch Adhäsionsmoleküle vermittelt, unter anderen den Integrinrezeptoren. Die Integrinrezeptoren sind in der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen involviert. Integrinrezeptoren sind an der Zellmembran lokalisiert und spielen eine entscheidende Rolle insbesondere bei der Wundheilung, der Angiogenese, der Zellmigration und Differenzierung, aber auch bei der Ansiedlung und Metastasierung von malignen Zellen. Integrine dienen entsprechend als Integratoren zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix, daher entstand auch in den frühen 80ern ihr Name (Hynes, 1987; Giancotti und Ruoslahti, 1999; Hynes, 2004).

Pierschbacher und Ruoslahti konnten bereits 1984 zeigen, dass die kürzeste Sequenz zur Bindung zwischen Komponenten der Extrazellulärmatrix und Integrinrezeptoren durch ein Tetrapeptid vermittelt wird (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984; Ruoslahti, 2003). Hynes fasste 2002 in einem Minireview zusammen, dass Integrinrezeptor-vermittelte Zelladhäsionen durch Oligopeptide oder durch spezifische Antikörper inhibiert werden können (Hynes, 2002).

Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass die zelluläre Adhärenz durch Erkennung und Bindung an spezifische Peptidsequenzen an extrazellulären Matrixproteinen vermittelt wird. Die Sequenzen verschiedener Ligand-Rezeptor-Interaktionen konnten charakterisiert werden.

Gegenstand der folgenden Dissertation ist die Untersuchung spezifischer integrinrezeptorblockierender Oligopeptide und deren Potential, Zell-Matrix-Adhäsionen in vitro sowie peritoneale Adhäsionen in vivo zu inhibieren.

1.2 Peritoneale Adhäsionen

1.2.1 Definition

Adhäsionen sind Verwachsungen von Geweben, die normalerweise unverbunden und frei beweglich sind. Verklebungen und Verwachsungen zwischen Serosaflächen der

Bauchhöhle entstehen durch Entzündungen, Verletzungen und operative Eröffnung der Bauchhöhle.

1.2.2 Historische Entwicklung

Seit über hundert Jahren sind peritoneale Adhäsionen als Folge abdomineller Eingriffe bekannt. Bereits 1872 wurde von Bryant in seiner Arbeit „Clinical lectures on intestinal obstruction“ über den letalen Ausgang eines Adhäsionsileus nach Entfernung einer Ovarialzyste berichtet (Bryant, 1872). Zahlreiche weitere Chirurgen beobachteten ebenfalls nach erfolgreichen Operationen mit zunächst unkompliziertem Heilungsverlauf lebensbedrohliche Komplikationen durch Verwachsungen. Seither wird intensiv an der Problematik der postoperativen „Verwachsungsbäuche“ geforscht. Im Jahr 1889 konnte von Dembowski in seiner Arbeit „Über die Ursachen der peritonealen Adhäsionen nach chirurgischen Eingriffen mit Rücksicht auf die Frage des Ileus nach Laparotomien“ auf die Induktion von Adhäsionen durch „fremde Körper, Ligaturen mit den entsprechenden Schnürstücken (...) und Brandschorfe“ als Ergebnis seiner Untersuchungen bei Hunden hinweisen. Er erkannte schon damals die Bedeutung von Fremdkörpern und Ischämien als Ursache für Adhäsionen (von Dembowski, 1889). Der nächste Meilenstein wurde von Payr 1911 gelegt, der die Bedeutung der ersten 48 Stunden für die Ausbildung von Adhäsionen erwähnt sowie den Zusammenhang zwischen Verwachsungen und Fibrinolyse postuliert (Payr, 1924). Payr erkannte ebenfalls als Ursache für Adhäsionen Läsionen des Peritoneums durch Tupfer und Bauchtücher sowie Austrocknung, chemische und thermische Einflüsse, Ischämien und Fremdkörper. Ätiopathologisch wurde erstmals durch Kern und Kuhbier sowie Swolin der Ablauf zur Entwicklung von Adhäsionen beschrieben, über Läsion des Peritoneums, Ausschwitzung von Fibrin bis zur bindegewebigen Organisation (Kern und Kuhbier, 1964; Swolin, 1966). Seither wurden eine Vielzahl an experimentellen und klinischen Untersuchungen von Methoden und Substanzen zur Prophylaxe von Adhäsionen durchgeführt. So wurde von Noble 1937 das Verfahren der Dünndarmplikatur eingeführt, hierbei werden interenterische Nähte zur Dünndarmfixation gelegt (Noble, 1937). Die im folgenden gesehenen Fistelbildungen führten 1960 zur Modifikation durch Childs und Phillips mittels transmesenterialen

Nähten (Childs und Phillips, 1960). Die Darmfixation durch innere Sonden wurde erstmals durch Baker 1959 beschrieben (Baker, 1959) und durch Dennis 1969 modifiziert (Dennis, 1969). In den letzten Jahrzehnten änderte sich die Strategie zur Prophylaxe von peritonealen Adhäsionen. Die Problematik des Adhäsionsileus kommt häufig erst bei Relaparotomien zum Tragen; oft tritt ein Adhäsionsileus erst Jahre nach dem letzten Eingriff auf.

Des Weiteren wurde die Entwicklung stark durch die Gynäkologie geprägt, da die Problematik der weiblichen Infertilität durch das Auftreten von Verwachsungen in den Vordergrund rückte. Entscheidend hierbei ist die Verschiebung des Schwerpunktes zur Kontrolle der Adhäsionen auf das innere Genitale (Menzies und Ellis, 1990; Drollette und Badawy, 1992).

In den letzten Jahrzehnten wurden die unterschiedlichsten Substanzen eingesetzt, um peritoneale Adhäsionen zu vermindern. Die Trennung der lädierten Oberflächen mit Stoffen wie Glaskörperflüssigkeit von Kalbsaugen, Olivenöl, Vaseline, Fischblasen und Karpfenperitoneum, Seidentüchern und Metallfolien sowie die Stimulation der Peristaltik mit Prostigmin, chinesischen Heilkräutern und Moorpäckungen konnten allerdings keine klinische Bedeutung erlangen (Richter, 1978). Die Prophylaxe der Darmadhäsionen mit Antikoagulantien zur Vorbeugung der Fibrinverklebung mit Heparin, Plasmin-Aktivator, Streptokinase, Urokinase und Fibrinolytika, reduzierte die Verwachsungen, doch das Risiko postoperativer Blutungen und Heilungsstörungen erhöhte sich (Evans et al., 1993). Ebenfalls nicht durchsetzen konnten sich Corticosteroide (Dexamethason) und nicht-steroidale-Antirheumatika (Ibuprofen) da die zu erwarteten Nebenwirkungen mit Immunsuppression, Wundheilungsstörungen und gastrointestinalen Ulzerationen einen klinischen Einsatz nicht zulassen (Di Zerega, 1994).

1.2.3 Epidemiologie

Peritoneale Adhäsionen sind nach großen bauchchirurgischen Eingriffen nahezu unvermeidbar. So konnten Weibel et al. zeigen, dass nach Appendektomie bei 51%

der Patienten Adhäsionen vorlagen, bei Patienten mit Mehrfacheingriffen stieg diese Zahl auf 93% (Weibel und Majno, 1973).

Mehrere systematische Studien zeigten bei 26% - 64% aller Dünndarmobstruktionen Adhäsionen und Briden als Ursache (Tabelle 1). Vor allem in den westlichen Industrieländern stellen Adhäsionen die häufigste Ursache des mechanischen Ileus dar, in den Entwicklungsländern stehen inkarzerierte Hernien im Vordergrund beim mechanischem Ileus. Menzies und Ellis zählten von allen chirurgischen Eingriffen 0,9% infolge von peritonealen Adhäsionen auf, bei Darmeingriffen stieg diese Zahl auf 3,3% (Menzies und Ellis, 1990). In der Gynäkologie steigt die Problematik der Adhäsionen zunehmend, bei 15% - 20% der weiblichen Infertilität stellen sich Adhäsionen als ursächlich dar (Drollette und Badawy, 1992). Bei derzeit steigender Anzahl von abdominellen Operationen weltweit und zunehmendem Alter der Bevölkerung sind peritoneale Adhäsionen von immer größerer Relevanz, nicht nur im klinischen Alltag, sondern auch im sozioökonomischen Bezug.

Tab. 1: Adhäsionen und Briden als Ursache von Darmobstruktionen (modifiziert nach Ellis, 1982)

Autor	Jahr	Ort	Anzahl Darmeingriffe insgesamt	Adhäsionen ursächlich (in Prozent)	Bemerkungen
Nemir, P.	1952	Philadelphia	430	33	
Perry, J.F. et al.	1955	Minneapolis	1252	31	
Raf, L.E.	1969	Stockholm	2295	64	ohne Inkarzerationen, M.Crohn, Neoplasma
Playforth, R.H. et al.	1970	Lexington	111	54	nur Dünndarm
Stewardson, R.H. et al.	1978	Chicago	238	64	nur Dünndarm
Ellis, H.	1982	London	253	26	nur Erwachsene

1.2.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Auch bei sehr schonender Präparation ist eine Traumatisierung des Peritoneums zur Darstellung der Organe und Durchführung der Operation unvermeidlich. Das

einschichtige Mesothel der Bauchhöhle wird nicht nur im Rahmen des gezielten Skalpelleinsatzes verletzt, auch der Einsatz von Haken, Klemmen, Tupfern und Tüchern sowie Austrocknung u.a. können das dünne Gewebe schädigen. Bei abdominalen Eingriffen sind folgende Manipulationen als Ursache der Verwachsungen anzusehen (De Lande und Jeekel, 2000; Ott, 2000; Treutner et al., 2001):

- Irritation der Darmoberfläche durch trockene Bauchtücher, Kompressen und Streifen
- Gebrauch aller Retraktoren mit Traumatisierung des Darmes und des Peritoneums
- Hitzeschädigungen durch heiße Kochsalzlösungen, feuchte heiße Bauchtücher ($>60^{\circ}\text{C}$), Operationslampen
- Anwendung grober, scharfer Klemmen und Massenligaturen, in deren Folge Nekrosen entstehen die durch sequestrierende Entzündungen abgestoßen werden
- Auskühlung und Austrocknung der Darmoberfläche
- Ischämien und Entzündungen des Darmes
- Irritation durch Fremdkörper, z.B. Talkum von gepuderten Handschuhen

1.2.5 Pathophysiologie

Peritoneale Adhäsionen entstehen nach dem bisherigen Kenntnisstand durch folgende pathophysiologische Mechanismen: Das Peritoneum besitzt als oberste Zellformation eine einschichtige Lage von polygonalen, flächig ausgebreiteten Deckzellen mit zentral gelegenem Zellkern. Das Peritonealmesothel ist eine dünne Zellschicht von nur 0,6-3 μm Dicke und das darunter liegende submesotheliale, dem Bauchfell angehörige, lymphgefäßreiche, lockere Bindegewebe besitzt eine Dicke von 10-20 μm . Beide entstammen entwicklungsgeschichtlich dem mittleren Keimblatt und haben wie das Mesenchym die Potenz zur Aktivierung des Gefäß-Bindegewebes (Buckman et al., 1976; Vipond et al., 1990). Durch Verletzung des Peritoneums kommt es durch Gefäß- und Gewebeläsionen zur lokalen Exsudation von Blut, Plasmaproteinen und Entzündungsfaktoren aus den geschädigten Strukturen. Ein erster Verschluss der Läsion erfolgt durch Thrombozytenanlagerung und Thrombozytenaggregation. Danach

findet die Aktivierung des Blutgerinnungssystems statt, was zur Bildung eines klebrigen Fibrinpfropfs führt. Das der Abdeckung verletzter Gewebe dienende Fibrin wirkt stark adhäsiv, so dass eng benachbarte intraabdominale Strukturen durch Fibrinverklebungen verbunden und in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden können. Mit zunehmender Gewebeerneuerung wird bei einem normalen Regenerationsprozess die Fibrinogenese durch eine Fibrinolyse abgelöst, die den Fibrinpropf abbaut. Dazu ist eine Plasminaktivierung aus dem intakten Mesothel erforderlich. Im geschädigten Epithel ist jedoch die Synthese der Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 durch Tumornekrosefaktor $\text{TNF}\alpha$ und die Interleukine IL-1 und IL-6 stimuliert, so dass die Aktivität des Gewebe-Plasminogen-Aktivators t-PA sinkt. Damit führt das initiale mesotheliale Trauma zu einer Reduktion der fibrinolytischen Aktivität in der Abdominalhöhle und zu einem Ungleichgewicht zwischen Fibrinogenese und Fibrinolyse.

Während der ersten Tage nach einer peritonealen Verletzung sind die Adhäsionen prinzipiell noch reversibel. Wenn jedoch aufgrund der herabgesetzten t-PA-Aktivität nur eine unzureichende Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt und damit die Zerlegung des Fibrins in seine Spaltprodukte nur unvollständig ablaufen kann, ist eine Lyse der temporären Adhäsionen nicht mehr möglich. Stattdessen löst die Fibrinablagerung im Rahmen der Wundheilungsreaktion einen Prozess der Gewebereparatur aus, der sich bis in das Fibringerüst hinein erstreckt. Innerhalb von 5 Tagen dringen proliferierende Fibroblasten, Granulozyten und Monozyten in das Fibrinnetz ein. Das Fibrin wird durch Kollagen als dauerhaften Bestandteil der Extrazellulärmatrix ersetzt, und im weiteren Verlauf kann es zu Einsprossungen von Kapillaren kommen. Es ist anzunehmen, dass die Adhäsion nach Migration der Fibroblasten in das geschädigte Gewebe nicht mehr reversibel ist und sich im Laufe von Wochen und Monaten zunehmend verfestigt. Aus den initialen Peritonealdefekten heraus haben sich permanente Verbindungen gebildet (De Lande und Jeekel, 2000).

Die Verwachsungen des Peritoneums folgen dem gesetzmäßigen Stadienverlauf:

- Die Verletzung oder Entzündung der Serosa und Subserosa führt reaktiv zu einem Ödem und zur Ausscheidung eines serösen oder seropulentes Exsudates.
- Koagulation des Exsudates mit Bildung von Fibrin
- Verklebung der serosabedeckten Bauchorgane und des parietalen Bauchfells im Bereich der Fibringerinnsel
- Entfällt die Entfernung des Fibrins, durch Steigerung der Proteaseaktivität oder andere Maßnahmen, schreitet die bindegewebige Organisation des Fibringerinnsels fort
- Drei Stunden nach Defektentstehung sind die Verklebungen so fest, dass eine Lösung nur unter erheblicher Defektbildung möglich ist; nach 24 Stunden führt ein Lösungsversuch bereits zu Einrissen der Muskularis
- Nach 36 Stunden beginnt die Vereinigung der submesothelialen Schichten über Einwachsen von Spindelzellen. Die Fibroblasten entstehen aus den multipotenten Zellen der Gefäßendothelien
- Gefäßneubildung durch einwachsendes, gefäßhaltiges Bindegewebe folgt nach zwei Tagen; nach drei Tagen lässt sich bereits ein Blutstrom im Endothelschlauch der neugebildeten Gefäße beobachten
- Leukozytenmigration mit nachfolgend Bildung von Granulationsgewebe
- Nach 28 Tagen lassen sich Arterien, Venen, Muskelzellen und Nervenfasern nachweisen

Für das Entstehen von Verwachsungen ist folglich das während der ersten Stunden und Tage herrschende Ungleichgewicht zwischen Fibrinogenese und Fibrinolyse ausschlaggebend. Im Bauchraum wird die Bildung von Adhäsionen durch die enge Nachbarschaft der peritonealen Membran gefördert. Es wird ersichtlich, dass nicht jede Verklebung zur Verwachsung führen muss, eine verwachsungsverhütende Maßnahme jedoch bereits Stunden nach Setzen des Serosadefektes wirksam werden sollte.

1.2.6 Therapie

Eine sichere Methode, die eine Bildung peritonealer Adhäsionen verhindert, ist derzeit nicht bekannt. Eine schonende Operationstechnik zur Vermeidung der zur Schädigung

des Peritoneums führenden Manipulationen bedeutet derzeit die beste Adhäsionsprophylaxe. Beobachtet wurde, dass bei Patienten mit Aszites ausgesprochen selten Adhäsionen auftreten. Dies ist der Grund für viele Untersuchungen, über die Erhaltung der Gleitfähigkeit der geschädigten Serosa Adhäsionen zu vermeiden. Verschiedenste Ansätze zur Vermeidung von peritonealen Adhäsionen wurden in Tierversuchen und klinischen Studien eingesetzt, bis dato wurde jedoch kein Agens generell akzeptiert (Treutner et al., 1995).

Treutner et al. zeigten bei einmaliger intraperitonealer Administration von Phospholipid vor Verschluss des Abdomens eine gute Effizienz zur Inhibition postoperativer Adhäsionen (Treutner et al., 1995).

1.3 Zelladhäsionen

Alle Zellen, außer Erythrozyten, treten aktiv in Beziehung zur umgebenen Extrazellulärmatrix. Dafür benutzen sie spezielle Bindungsstellen, Rezeptoren, an ihrer Zelloberfläche. Die Verbindung kommt entweder direkt durch Interaktion des Rezeptors oder durch Zwischenschaltung von Adhäsionsproteinen zustande. Die Zell-Matrix-Verbindungen dienen der mechanischen Verankerung der Zellen, sie haben darüber hinaus Einfluss auf zahlreiche Zellfunktionen wie Ernährung, Abwehr und Reparatur. Diese Zusammenhänge spielen in der Zell- und Tumorbilogie eine wichtige Rolle.

1.3.1 Adhäsionsmoleküle

Die Adhäsion von Zellen zum Beispiel an das Endothel primärer und sekundärer Organe wird vermittelt über zellmembrangebundene Rezeptoren, die Adhäsionsmoleküle. Die Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle in der Ontogenese, Wundheilung, Entzündung und der Progression maligner Tumoren. Die Funktion der Adhäsionsmoleküle besteht in der Organisation der Bindungen zwischen Zellen an Zellen oder an andere Strukturen des Organismus und auch deren Lösung voneinander. Des weiteren spielen Adhäsionsmoleküle eine Rolle in der Signaltransduktion. Signale aus der Zellumgebung werden aufgenommen und nach

intrazellulär weitergegeben. Damit können fundamentale Veränderungen in der Zelle ausgelöst werden.

Zelladhäsionsmoleküle sind eine biochemisch heterogene Gruppe membranständiger und transmembranöser Moleküle, die aufgrund struktureller biochemischer Verwandtschaften und Sequenzhomologien in verschiedene Molekülfamilien unterteilt werden. Hierzu gehören u.a. die Selektine, die Immunglobulinsuperfamilie, die Cadherine sowie die große Gruppe der Integrine (Pignatelli und Vessey, 1994; Heicappell, 1996; Okegawa et al., 2002). Eine weitere Einteilung der Adhäsionsmoleküle erfolgt über deren Funktion in drei verschiedene Klassen, die calciumabhängigen homotypischen Adhäsionsmoleküle (Cadherine), die Substratadhäsionsmoleküle (Integrinrezeptoren), und die heterotypischen Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) (Heicappell, 1996). Insbesondere die Promotion der Interaktion und Zelladhäsion zwischen Extrazellulärmatrix und Zellen wird über Integrine vermittelt (Ruoslahti und Engvall, 1980; Ruoslahti und Pierschbacher, 1987).

Die Adhäsionsmoleküle sind demnach transmembranöse Glykoproteine, die biochemisch zwar relativ gleichartig aufgebaut sind, sich jedoch oft erheblich in ihrer jeweiligen Funktion unterscheiden.

1.3.2 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix ist eine organotypisch, heterogen zusammengesetzte Struktur. Sie dient zunächst als Wachstumsmatrix für die auf ihr gelagerten Zellen. Darüber hinaus können Differenzierung, Motilität und äußere Form von Zellen durch die Extrazellulärmatrix entscheidend beeinflusst werden. Die Hauptbestandteile der peritonealen Extrazellulärmatrix sind Fibronektin, Laminin, Kollagen I, III und IV, Proteoglykane, Tropoelastin und Vitronectin (Rennard et al., 1984). Intakte Mesothelzellen sitzen einer dünnen Kollagen Typ IV- und Laminin-positiven Basalmembran auf. Darunter befindet sich Bindegewebe, bestehend aus Fibroblasten, kollagenen Fasern, Adipozyten, Leukozyten und zahlreichen Lymph- und Blutgefäßen. Die Bestandteile der Extrazellulärmatrix und Mesothelzellen stehen in einer engen

Wechselbeziehung zueinander, die das Adhäsions- und Proliferationsverhalten der Mesothelzellen reguliert (Yen et al., 1997).

Wechselwirkungen zwischen peritonealen Mesothelzellen und der Extrazellulärmatrix stellen einen entscheidenden Pathomechanismus in der Entwicklung der peritonealen Fibrosierung dar. Es konnte gezeigt werden, dass bei Peritonitis die Konzentration der Extrazellulärmatrix-Moleküle, insbesondere Fibronectin, Kollagen I und III, in der submesothelialen Zone deutlich ansteigt. Eine derartige überschießende Reaktion führt zur Fibrosierung des Peritoneums (Renvall et al., 1987). Die mesotheliale Extrazellulärmatrix spielt auch eine bedeutende regulative Rolle beim Wachstum und der Ausbreitung von malignen Tumoren. Darüber hinaus nehmen Bestandteile der Extrazellulärmatrix Einfluss auf die Viabilität von Endothelzellen (Meredith et al., 1993).

Extrazellulärmatrix-Moleküle scheinen dabei Integrinrezeptor medierte Signale an die Zellen weiterzugeben. Integrinrezeptoren binden spezifisch an Makromoleküle der Extrazellulärmatrix wie Fibronectin, Laminin oder Kollagen (Liotta, 1992; Heicappell, 1996).

Zahlreiche Untersuchungen haben nachweisen können, dass verschiedene Zelladhäsionsmoleküle der Integrinrezeptorfamilie entscheidend in die Interaktion von Tumorzellen und Entzündungszellen mit den unterschiedlichen Komponenten der Extrazellulärmatrix involviert sind (Hyacinthe et al., 1995; Brenner et al., 2001; Smyth et al., 1993; Böhle et al., 2002). Es wird angenommen, dass es sich bei der Metastasierung von Tumorzellen um Prozesse handelt, die mit dem Verlust der normalen Extrazellulärmatrix-Kontakte einhergehen.

1.3.3 Fibronectin

Die Fibronektine gehören zu der Klasse von Glykoproteinen mit hohem Molekulargewicht. Das Molekulargewicht von Fibronectin ist ca. 225 kD. Sie kommen in vivo in fast allen Körperflüssigkeiten, im lockeren Bindegewebe, in Basalmembranen und Granulationsgewebe vor. In vitro werden Fibronektine von fast allen Zellen synthetisiert; in vivo erfolgt die Synthese hauptsächlich in der Leber. Fibronectin besteht aus je einer α - und einer γ - Peptidkette (siehe Abb. 1). Im Zellkulturmedium

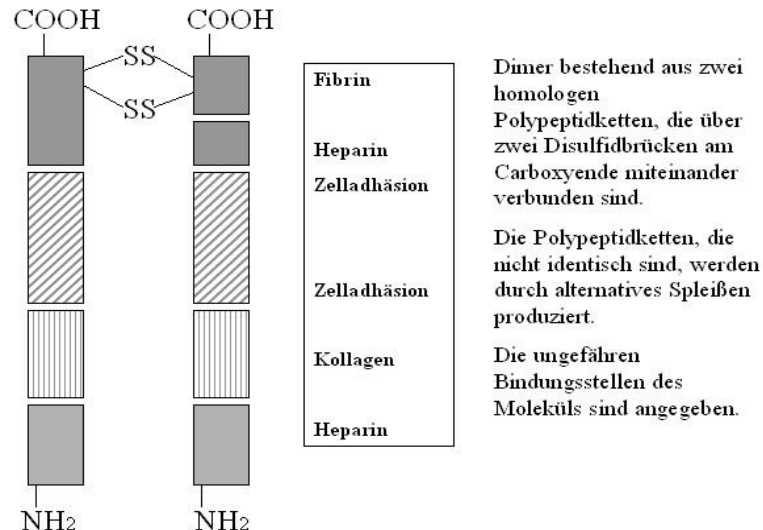
und im Plasma befinden sich die Fibronektine in gelöster Form, in der Extrazellulärmatrix in ungelöster Form von Multimeren, die durch Disulfid-Brücken gebunden sind.

Zu den hauptsächlichen biologischen Aktivitäten der Fibronektine gehört die Unterstützung der Zelladhäsion. Die Adhäsion wird über spezifische Aminosäuresequenzen vermittelt. Fibronektin bindet an Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Epithelzellen, Endothelzellen, Monozyten, neutrophile Zellen und Blutplättchen. In gelöster Form, als Plasmafibronektin, kann Fibronektin an denaturiertes Kollagen und Fibrin binden, sowie von der Extrazellulärmatrix inkorporiert werden. So kann Fibronektin die Zellmigration zum Beispiel bei der Wundheilung vermitteln, die Phagozytose von Zellrückständen unterstützen und den Gewebewiederaufbau nach Trauma oder Verletzung unterstützen (McKeown-Longo, 1987). Das Fibronektinmolekül beinhaltet verschiedene Bindungsdomänen, unter anderem zu Fibrin, Heparin, *Staphylococcus aureus*, DNA, Kollagen, Gelatin und zu Zelloberflächenantigenen, insbesondere den Integrinen.

Auf der α -Peptidkette liegt das GRGDS Motif (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), auf der γ -Peptidkette liegt das KQAGDV Motif (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) (Calvete et al., 1992; Gresham et al., 1992). Zur genaueren Veranschaulichung siehe auch Abb. 1.

Abb. 1: Schematische Darstellung von Fibronectin mit Bindungsstellen (aus www.zum.de/neurogenetik/43.html)

Struktur von Fibronectin, Bindungsstellen



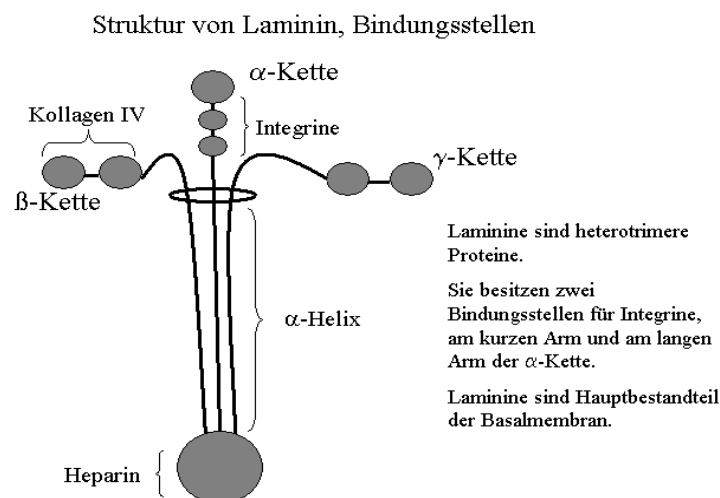
1.3.4 Kollagen

Kollagen gehört zu den Strukturproteinen der Extrazellulärmatrix. Zu den außerordentlichen Eigenschaften des Kollagens gehört enorme Zugfestigkeit und hohe Dehnbarkeit. Synthetisiert wird Kollagen im endoplasmatischen Retikulum. Derzeit sind 27 unterschiedliche Kollagentypen bekannt. Allen Kollagentypen gemeinsam ist deren Aufbau aus drei linksläufigen Polypeptidketten (α -Ketten), die in Form einer rechtsdrehenden Tripelhelix (Superhelix) umeinander gewunden sind. Die dichte Wicklung ist ausschlaggebend für die Zugfestigkeit von Kollagenfasern. Auffallend an der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) des Kollagens ist, dass jede dritte Aminosäure Glycin ist. Die Kollagene werden in mehrere Untergruppen unterteilt, die fibrillären Kollagene (Typ I, II, III, V und IX), die netzbildenden Kollagene (Typ IV, VIII und X), fibrillenassoziierten Kollagene (Typ IX, XII und XIV) sowie die perlenschnurartigen Kollagene, die Verankerungsfibrillen und Kollagene mit Transmembrandomänen.

1.3.5 Laminin

Laminine sind Glykoproteinkomplexe, die Bestandteil der Extrazellulärmatrix sind. Sie bilden den Hauptbestandteil der Basalmembran. Laminine sind Heterotrimäre, die aus drei umeinander gewundenen glykosylierten (α -, β - und γ -) Polypeptidketten bestehen (siehe Abb. 2).

Abb. 2: Schematische Darstellung von Laminin mit Bindungsstellen (modifiziert aus Molecular Cell Biology, Lodish et al., 2003)



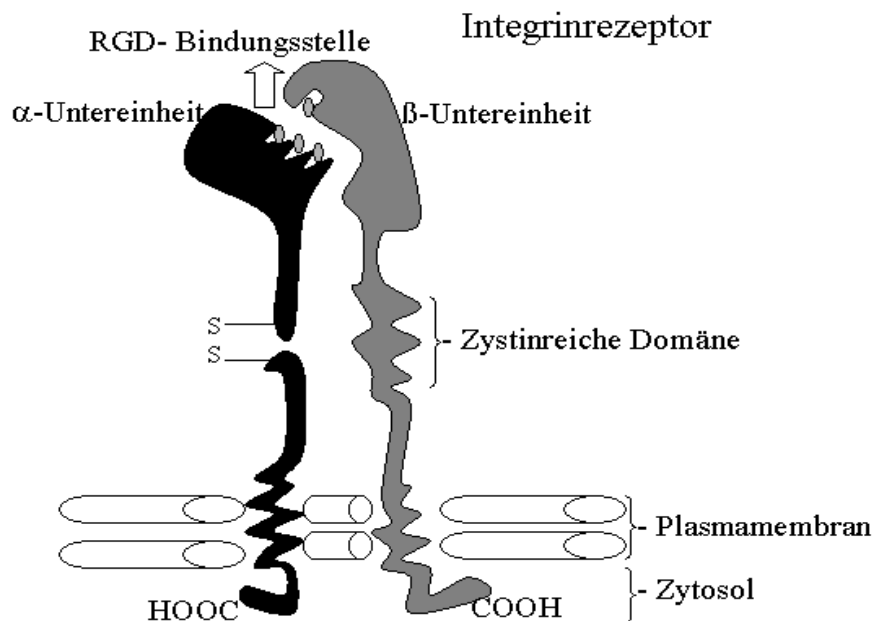
Laminin enthält mehrere funktionelle Domänen. Hierzu gehören die Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren, verschiedene Proteine wie die Kollagene I und IV sowie für Heparine und Integrine. Auch die Tripeptidsequenz RGD findet sich in Laminin. Funktion der Laminine ist die Bindung von Zellen an die Basalmembran und die Vermittlung von Motilität und Ausdifferenzierung von Zellen (Suzuki et al., 2005).

1.3.6 Integrinrezeptoren

Integrinrezeptoren sind eine Gruppe von heterodimeren Glykoproteinen. Sie bestehen aus je einer nicht kovalent gebundenen α - und β -Kette. Die Integrinrezeptoren sind transmembranös gelegen. Die α - und β -Untereinheiten gliedern sich in eine lange extrazelluläre Domäne, eine einzelne transmembranöse Region und eine, mit

Ausnahme von β_4 , kurze intrazelluläre Sequenz (Argraves et al., 1987; Berridge et al., 1988; Hynes, 1992). Zur genaueren Veranschaulichung siehe auch Abb. 3.

Abb. 3: Schematische Struktur eines Integrinrezeptors (modifiziert aus Molecular Biology of the Cell, Alberts et al., 2002)



Jede Zelle besitzt mindestens einen Integrinrezeptortyp auf ihrer Zelloberfläche. In der Literatur sind bisher über 24 unterschiedliche α/β - Heterodimere beschrieben. Einige α -Untereinheiten können mit mehr als einer β -Untereinheit kombiniert werden (Hynes, 1992; Van der Flier und Sonnenberg, 2001).

1.3.7 Funktion der Integrinrezeptoren

Funktionell sind die Integrinrezeptoren von besonderer Bedeutung sowohl für die Zell-Zell- als auch für die Zell-Matrix-Interaktionen. Neben der Adhäsion an Substrate der Extrazellulärmatrix leiten Integrinrezeptoren Signale an intrazytoplasmatische Strukturen weiter. Die meisten Integrinrezeptoren erkennen verschiedene Moleküle der Extrazellulärmatrix, wobei auch die Extrazellulärmatrix-Moleküle an mehrere unterschiedliche Integrinrezeptoren binden können (Westlin, 2001). Die meisten Zellen

exprimieren mehrere unterschiedliche Integrinrezeptoren an ihrer Zelloberfläche. Je nach funktioneller Aufgabe der Zelle sind die unterschiedlichen Integrine an der Zelloberfläche hoch- oder herunterreguliert. Die Zellen sind somit in der Lage, simultan an mehrere unterschiedliche Extrazellulärmatrix-Moleküle oder Zellen zu binden.

Die unterschiedlichen Rezeptoren, die auf Zellen exprimiert sind, können an die gleichen Liganden binden. Die Bindung an die Liganden kann jedoch sowohl an der gleichen Aminosäuresequenz als auch unterschiedlichen Aminosäuresequenzen erfolgen (Rupp und Little, 2001).

Für die Interaktion zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix benötigen Integrinrezeptoren divalente Kationen wie Calcium oder Magnesium (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Im Rahmen der Interaktion zwischen Zelloberfläche und dem Zellinneren dienen dabei Tyrosinkinasen, GTPasen, Proteinkinase C und Calcium als „second-messenger-Systeme“ (Heicappell, 1996; van der Flier und Sonnenberg, 2001).

Brooks et al. konnten zeigen, dass insbesondere $\alpha_v\beta_3$ Integrin direkt an der Neovaskularisation von Gewebe beteiligt ist. Die Neovaskularisierung, d.h. die Angiogenese, die bei der Tumorentstehung, Wundheilung und Gewebsneubildung benötigt wird, wird durch Zytokine induziert. Die Zytokinausschüttung erfolgt entweder durch Gewebstrauma oder durch die Tumoren direkt. Die Zytokine ermöglichen die Gefäßeinsprossung durch Veränderung der Integrinexpression auf der Zelloberfläche, insbesondere einer vermehrten Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$. Dadurch können Endothelzellen vermehrt mit Extrazellulärmatrix-Molekülen interagieren, wobei vor allem Fibronectin und Vitronectin beteiligt zu sein scheinen (Brooks et al., 1994a).

Gleichzeitig werden Signale über die Integrinrezeptoren aus der extrazellulären Umgebung nach intrazellulär weitergeleitet. So zeigten Leavesley et al., dass nach Bindung des Integrinrezeptors auf der Oberfläche von Endothelzellen ein Kalzium-Signal ausgelöst wird, welches für die Zellbeweglichkeit erforderlich ist (Leavesley et al., 1992).

Durch spezifische Antikörper (LM609) und auch durch spezifische Oligopeptide (zyklisches RGD), die gegen das $\alpha_v\beta_3$ Integrin gerichtet sind, kann die

Neovaskularisation unterbrochen werden. Hierbei wird eine Apoptose der proliferierenden Gefäßzellen induziert (Brooks et al., 1994b).

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Abkürzungen aller Aminosäuren als Einzelbuchstaben- und Dreibuchstabencode.

Tab. 2: Aminosäure-Kodierung

Aminosäure	Einzelbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

1.3.8 Spezifität der Integrinrezeptoren

Die Familie der Integrinrezeptoren besteht aus mindestens 14 verschiedenen α -Untereinheiten und ungefähr 8 verschiedenen β -Untereinheiten, die in zahlreichen Kombinationen assoziieren.

Die größte Familie bildet die Gruppe der β_1 Integrine, auch bezeichnet als sogenannte very late appearing antigens (VLAs). Diese Gruppe der β_1 Integrine können auf der Oberfläche der Lymphozyten sowie auf den meisten Zellen ektodermalen Ursprungs nachgewiesen werden (De Stooter et al., 1989; Zutter et al., 1990; Hynes, 1992). β_1 Integrine dienen als Bindungsstelle für Extrazellulärmatrix-Moleküle, im speziellen für Kollagene, Fibronectin, Vitronectin und Laminin. Über die α_2 und α_3 Untereinheiten

werden aber auch Zell-Zell-Kontakte hergestellt. Immunhistochemische Untersuchungen haben eine β_1 Aktivität nicht nur an basalen und laterobasalen Zelloberflächen, sondern auch zwischen Zellen eines Zellverbandes nachgewiesen (Bosman, 1993).

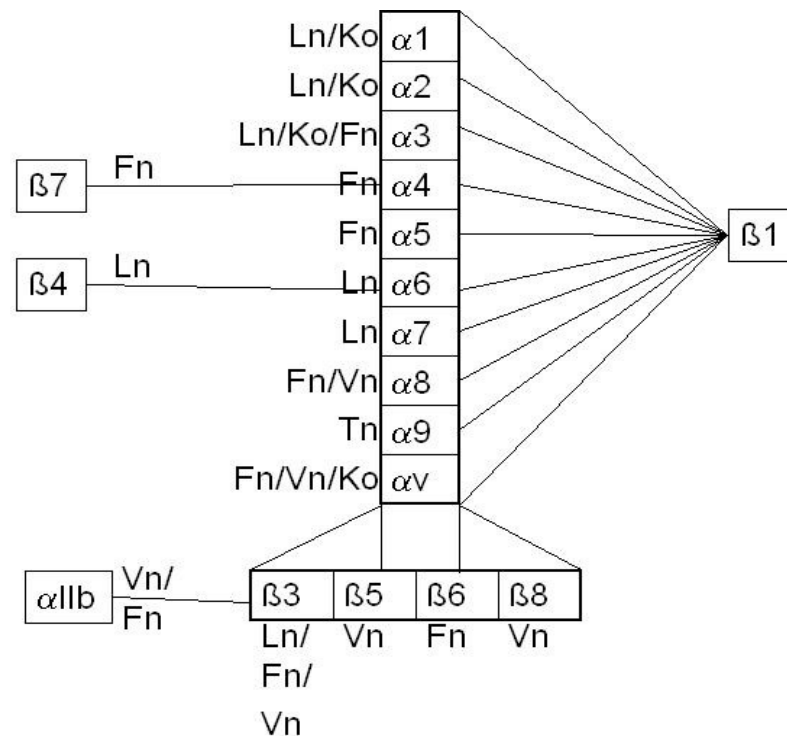
Der klassische Fibronectin Rezeptor, das $\alpha_5\beta_1$ Integrin, interagiert nur mit einem einzigen Bestandteil der Extrazellulärmatrix, dem Fibronectin (Brown und Juliano, 1985). Häufiger erkennen die Integrinrezeptoren jedoch mehrere Bestandteile der Extrazellulärmatrix.

Die Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_4\beta_1$ erkennen und binden beide an Fibronectin, jedoch an unterschiedlichen Regionen (Guan und Hynes, 1990). Auch die Laminin-bindenden Integrine $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ binden an unterschiedliche Regionen des Laminins (Hall et al., 1990). Andere Integrine binden an die gleiche Region der Extrazellulärmatrix-Moleküle (Elices et al., 1991).

Die Überlappungen der Bindungsregionen und Bindungspartner der Integrinrezeptoren erscheint paradox. Die Bindung der Integrinrezeptoren an die spezifischen Bindungspartner der Extrazellulärmatrix löst intrazellulär jedoch unterschiedliche Funktionen aus. Signale, die durch die Integrinrezeptoren von der Extrazellulärmatrix in das Zellinnere transduziert werden, können Veränderungen der Genexpression triggern (Juliano und Haskill, 1993).

Die einzelnen Integrinrezeptoren und deren Bindungspartner sind in Abb. 4 zusammen dargestellt.

Abb. 4: Integrinrezeptoren: Heterodimere der Untereinheiten und Extrazellulärmatrix-Bindungspartner (modifiziert nach Heino, 1996)



Fn Fibronectin; *Vn* Vitronectin; *Ko* Kollagen; *Ln* Laminin; *Tn* Tenascin

Die Integrinrezeptoren $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ sind die hauptsächlichen Kollagen-bindenden Rezeptoren, wobei $\alpha_1\beta_1$ vorzugsweise an Kollagen Typ IV bindet, jedoch auch an Kollagen Typ I und Laminin.

1.3.9 Integrinspezifische Oligopeptide

Die Integrinrezeptoren erkennen nicht die ganze Struktur der Makromoleküle, an die sie binden – Oligopeptide von weniger als 10 Aminosäuren dienen als Erkennungssequenzen (Domänen) und sind für die Bindung hinreichend (Okegawa et al., 2002). Die Aminosäuresequenzen der zellbindenden Domänen der Integrinrezeptoren sind für verschiedene Moleküle der Extrazellulärmatrix bekannt. Insbesondere die Bindung an Fibronectin ist durch eine spezifische Sequenz von Aminosäuren charakterisiert. Diese enthält als kleinste Einheit die Aminosäurekombination Arginin – Glycin – Asparaginsäure (RGD) (Ruoslahti und Pierschbacher, 1986).

Die Arbeitsgruppe um Whalen et al. konnte durch die spezifische Oligopeptidsequenz GRGDS (Glycin–Arginin–Glycin–Asparaginsäure–Serin) Tumorzelladhäsion an die Extrazellulärmatrix inhibieren (Whalen und Ingber, 1989). Die Bindung der Oligopeptidsequenz RGD an andere Extrazellulärmatrix-Moleküle konnte ebenfalls charakterisiert werden (Ruoslahti, 1996; Hynes, 1992).

Die Oligopeptidsequenz LDV (Leu-Asp-Val) bindet nicht nur an Fibronektin, sondern auch an Laminin, einen weiteren Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix. Die spezifischen Aminosäuresequenzen LDV (Leu-Asp-Val) sowie EILDV (Glu-Ile-Leu-Asp-Val) bilden die Liganden von Fibronektin und Laminin zu Zelladhäsionsmolekülen, den Integrinen (Komoriya et al., 1991; Wayner und Kovach, 1992).

Die Bindungsstelle des Fibrinogens sowie verschiedener Kollagene kann mit der Aminosäuresequenz KQAGDV (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val) kompetitiv geblockt werden (Gresham et al., 1992). Im Rahmen der Wundheilung wird die Zellmigration in das Wundgebiet, Zelladhäsion von Makrophagen und Thrombozyten an Fibrinogen und untereinander sowie z.T. die Aktivierung der Makrophagen zur Sekretion von Zytokinen durch Integrinrezeptoren vermittelt. Als Bindungsstellen konnten die Aminosäuresequenzen KQAGDV und RGD identifiziert werden (Calvette et al., 1992; Blystone et al., 1994).

Verschiedene Arbeitsgruppen setzten diese spezifischen Oligopeptide zur Adhäsionsinhibition von Integrinrezeptoren in vitro und in vivo ein. So konnten Böhle et al. zeigen, dass die Adhäsion von Blasenkarzinomzellen an Extrazellulärmatrix in vitro und in vivo an Urothel durch eine Kombination von spezifischen Oligopeptiden (GRGDS, EILDV und KQAGDV) inhibiert werden kann (Böhle et al., 2002). Die Adhäsionsinhibition von Tumorzellen an Extrazellulärmatrix-Moleküle konnte auch für andere Tumorentitäten gezeigt werden (Whalen und Ingber, 1989; Yamada et al., 1990; Li et al., 1997). Weitere Therapieansätze wurden bei entzündlichen Erkrankungen durchgeführt, z.B. bei der rheumatoiden Arthritis (Laberge et al., 1995), dem Asthma bronchiale (Barbadillo et al., 1995) und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Podalski, 1991; Powrie und Leach, 1995).

1.3.10 Modifizierte Oligopeptide

Mit wenigen Ausnahmen werden sowohl synthetische als auch natürliche Oligopeptide in vivo durch Peptidasen und Proteasen abgebaut. Nach Abbau der Oligopeptide in vivo verbleiben am Ende nur einzelne Aminosäuren, die dann funktionslos sind. Der schrittweise proteolytische Abbau von Peptiden findet von den beiden Enden statt, von denen aus nach und nach einzelne Aminosäuren abgespalten werden. Der Abbau erfolgt zügig, bis eine resistendere Verbindung den Abbau stoppt oder aufhält. Es gibt Verbindungen zwischen bestimmten Aminosäuren, die resistenter gegenüber proteolytischen Abbau sind als andere. Hierbei handelt es sich insbesondere um Aminosäureverbindungen mit Prolin.

In den letzten Jahren wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt zum therapeutischen Einsatz von synthetischen Peptiden in in vivo Versuchen (Sundaram et al., 2002; Aina et al., 2002). Es zeigte sich, dass ein Hauptproblem des therapeutischen Einsatzes die kurze biologische Verfügbarkeit der Peptide im Blutkreislauf darstellt. Durch spezifische Modifikationen kann die biologische Verfügbarkeit der Oligopeptide verlängert werden (Galati et al., 2003).

Die hier eingesetzten modifizierten Oligopeptide wurden als zyklische Oligopeptide hergestellt. Hierzu wurde an das 3'Ende jeweils ein Serin und ein Histidin angehängt und an das 5'Ende eine Kombination aus Asparaginsäure und Lysin. Ziel war die Verhinderung eines frühzeitigen Abbaus der Oligopeptide durch Proteasen. Die veränderten Bindungseigenschaften von einem linearen Oligopeptid sollten ebenfalls vermieden werden.

1.4 Problem- und Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, spezifische Oligopeptide und deren Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition sowohl in vitro als auch in vivo zu überprüfen.

Die Adhäsion von Zellen an Moleküle der Extrazellulärmatrix ist ein Prozess, der durch die Interaktion dieser Moleküle mit Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt wird. Die Adhäsion von Endothelzellen an eine provisorische Matrix, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen, ist einer der grundlegenden Schritte für die Entstehung von peritonealen Adhäsionen.

Zelladhäsion-blockierende Oligopeptide sind häufig homolog zu den Bindungsstellen der jeweiligen physiologischen Liganden. So ist das bekannte Integrin blockierende Motiv RGD in Fibronectin zu finden und stellt die Bindungsregion des Fibronectins an Integrin dar. Das eingesetzte Oligopeptid GRGDS, mit der kleinsten funktionellen Aminosäuresequenz RGD, stellt die Bindungsstelle der Integrine zu Fibronectin dar, EILDV jene für Laminin und Fibronectin und KQAGDV für Kollagen. Die einzelnen Oligopeptide wurden jeweils auch in modifizierter Form eingesetzt. Modifiziertes GRGDS wurde als Inhibitor der Adhäsion zu Fibronectin, modifiziertes EILDV als Inhibitor zu Fibronectin und Laminin und modifiziertes KQAGDV respektive zu Kollagen eingesetzt.

1.4.1 Adhäsionsinhibition in vitro

Zunächst wurde die Fähigkeit von spezifischen Oligopeptiden untersucht, Adhäsionen von Fibroblasten an Moleküle der Extrazellulärmatrix in vitro zu inhibieren. Eingesetzt wurden spezifische Oligopeptide sowie modifizierte Oligopeptide mit zyklischen Eigenschaften. Die Oligopeptide wurden jeweils einzeln und in Kombinationen von unterschiedlichen Konzentrationen appliziert. Als Positivkontrolle wurde in den in vitro Versuchen zur Adhäsionsinhibition ein kommerziell erhältliches Phospholipid eingesetzt.

1.4.2 Reduktion peritonealer Adhäsionen nach Serosaschädigung in vivo

In einem in vivo Tiermodell wurde die Fähigkeit von spezifischen und modifizierten Oligopeptiden, peritoneale Adhäsionen zu vermeiden, getestet. Als Kontrolle diente ebenfalls Phospholipid.

II Material und Methoden

2.1 Zellen

2.1.1 Fibroblasten und Zellkultur

Die Zelllinie NIH / 3T3 wurde ursprünglich aus murinen Fibroblasten etabliert. Die Zellen wurden in Kulturflaschen in 20 ml Gebrauchsmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin und 1% Streptomycin) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Passagen erfolgten jeweils zweimal wöchentlich. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums für ca. 5 min mit 5 ml pro Kulturflasche Cell Dissociation Solution (CDS) unter Schütteln gelöst. Zur Inaktivierung der CDS wurden die Zellen nach der Ablösung von den Kulturflaschen zunächst zentrifugiert (10 min, 70 g) und dann in RPMI 1640 resuspendiert. Jeweils 10⁶ Zellen wurden in 20 ml Gebrauchsmedium zur weiteren Kultur in eine Kulturflasche ausgesetzt. Zwischen zwei Passagen erfolgte jeweils ein Mediumwechsel.

Material Antibiotika die Stammlösungen enthielten Penicillin (500E ml⁻¹) und Streptomycin (500µg ml⁻¹; beide BIOCHROM, Berlin, Germany). **Aqua ad injectabilia** (BRAUN, Melsungen, Germany) diente zum Ansetzen von Puffern und Lösungen. **Begasungsbrutschrank** (B5060 EK-02; HERAEUS, Hannover, Germany). **Fötales Kälberserum, FCS** (BIOCHROM, Berlin, Germany) wurde zur Komplementaktivierung für 30 min auf 56°C erhitzt und bei -20°C gelagert. **Gewebekulturflaschen** (Falcon, 75cm²; BECON DICKINSON, Heidelberg, Germany). **RPMI 1640** (Rosewell Park Memorial Institut Kulturmedium; BIOCHROM, Berlin, Germany) wurde als Trockensubstanz (10,41 gr l⁻¹) und NaHCO₃ (2 gr l⁻¹) mit aqua ad injectabilia hergestellt, auf pH 7,2 bei 280-290 osm eingestellt und bei 4°C gelagert (INVITROGEN/GIBCO, Eggenstein, Germany).

2.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Probe der erhaltenen Zellsuspension im Verhältnis 1:20 mit Trypanblau vermischt und lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da Trypanblau nicht durch die Membran lebender Zellen

dringen kann, sind bei dieser Färbung nur tote Zellen intensiv blau gefärbt, vitale Zellen hingegen erscheinen farblos. Zellsuspensionen mit weniger als 80 % lebender Zellen wurden verworfen. Alle folgenden Zellzahl-/Vitalitätsbestimmungen erfolgten nach diesem Schema.

Material **Neubauer Zählkammer** (BRAND; Ludwigshafen; Germany). **CDS** Cell Dissociation Solution (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). **Trypanblau** (BIOCHROM, Berlin, Germany). **Kühlzentrifuge** (Hettich Rotixa/RP; BHG HERNLE, Hamburg, Germany).

2.1.3 Kryokonservierung / Auftauen von Zellen

Kultivierte Zellen wurden vor dem Einfrieren einmal in RPMI 1640 mit 20 % FCS und 1% Penicillin und Streptomycin gewaschen und gezählt. Jeweils $2-5 \times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml des beschriebenen Mediums nach Zusatz von 10 % DMSO für 8 h mit Hilfe einer Einfrierbox, die mit Isopropanol gefüllt war, langsam auf -70°C heruntergekühlt. Die Langzeitkonservierung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Einfriereröhrchen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension mit dem DMSO schnell in 50 ml Gebrauchsmedium verdünnt. Nach einer Zentrifugation bei 400 g, 10 min und 4°C wurde das Zellpellet erneut in 50 ml Medium gewaschen und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension im Gebrauchsmedium sowie die Dauerkultur.

Material **DMSO** (Dimethylsulfoxid, SIGMA, Deisenhofen, Germany). **Einfrierbox** (NALGENE, Rochester, USA).

2.2 Zelladhäsionsassay

Das hier angewandte Verfahren beruht im wesentlichen auf dem von Böhle et al. beschriebenen Adhäsions-Assay (Böhle et al., 2002). Fibroblasten wurden in Gegenwart oder Abwesenheit der jeweiligen zu testenden adhäsionsinhibierenden Suspensionen mit verschiedenen immobilisierten Adhäsionsproteinen und Adhäsionsbestandteilen inkubiert. Folgend wurden die nicht gebundenen Zellen durch Überkopf-Zentrifugation entfernt und die Menge der adhärenen Zellen durch MTT-

Färbung bestimmt. Bei der MTT Färbung wird die Zellviabilität anhand der Hemmung der Succinatdehydrogenase bestimmt. Das Substrat Tetrazoliumbromid (MTT) wird zum wasserunlöslichen Formazan reduziert. Es bilden sich dunkle Formazankristalle die mit Lysepuffer (DMSO) in Lösung gehen. Der Koeffizient der Extinktion wurde photometrisch bestimmt.

2.2.1 Spezifische Oligopeptide

Eingesetzt wurden zelladhäsionsblockierende Oligopeptide, die homolog zu den Bindungsstellen der jeweiligen physiologischen Liganden der Extrazellulärmatrix waren. GRGDS stellt die Bindungsregion in Fibronectin zu Integrinrezeptoren dar, EILDV bei Laminin und KQAGDV bei Kollagen und Fibronectin.

Material **GRGDS** *H-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-OH (BACHEM, Heidelberg, Germany)*, **EILDV** *H-Glu-Ile-Leu-Asp-Val-OH (BACHEM, Heidelberg, Germany)*, **KQAGDV** *H-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-OH (BACHEM, Heidelberg, Germany)*

1.3.5 Modifizierte Oligopeptide

Um die biologische Verfügbarkeit zu verlängern, wurden die spezifischen Oligopeptide modifiziert. Die modifizierten Oligopeptide wurden durch eine Veränderung der Peptidsequenz zu zyklischen Peptiden modifiziert (modGRGDS, modEILDV und modKQAGDV).

Material **modGRGDS** *SHGRGDSDDK: H-Ser-His-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Asp-Asp-Lys-OH (BACHEM, Heidelberg, Germany)*, **modEILDV** *SHEILDVKDK: H-Ser-His-Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Lys-Asp-Lys-OH (BACHEM, Heidelberg, Germany)*, **modKQAGDV** *SHKQAGDVDK: H-Ser-His-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-Asp-Lys-OH (BACHEM, Heidelberg, Germany)*

1.3.6 Angiotensin

Bei den Adhäsionsversuchen wurde Angiotensin als Peptidkontrolle in einer Konzentration von jeweils 1 mM eingesetzt.

Material **Angiotensin** *(SIGMA, Deisenhofen, Germany)*

1.3.7 Phospholipid

Bei den Adhäsionsversuchen wurde als Positivkontrolle ein kommerziell erhältliches Phospholipid eingesetzt, von dem die Fähigkeit zur Verminderung der peritonealen Adhäsionen in vivo bekannt ist.

Material Phospholipid (*Liposome Solution 1,5%, FRESenius KABI, Bad Homburg, Germany*)

2.2.5 Zelladhäsionsassay

Eingesetzt wurden 96-well Mikrotiterplatten, die je Napf mit immobilisierten Molekülen der Extrazellulärmatrix in Rxx10+-Medium je 50 µl beschichtet wurden. Die Versuche erfolgten mit Mischmatrix, einer Kombination aus je 10 µg ml⁻¹ Fibronectin, Kollagen und Laminin, oder mit einem Monolayer aus Fibronectin 30 µg ml⁻¹. Nach Inkubation für sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Überstände abpipettiert. Anschließend wurden, je nach Versuchsansatz, verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen in Rxx10+ Medium gelöst und je 50 µl pro Napf einpipettiert. Direkt folgend wurden die Zellen ausplattiert. Hierzu mussten die Zellen auf eine Konzentration von 6 x 10⁵ ml⁻¹ in RPMI Medium eingestellt werden. Um eine Zellzahl von 30000 Zellen pro Napf zu erzielen, wurden pro Napf 50 µl Zellsuspension einpipettiert. Die Zellen wurden in der Platte herrunterzentrifugiert mit 70 g über 5 min und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

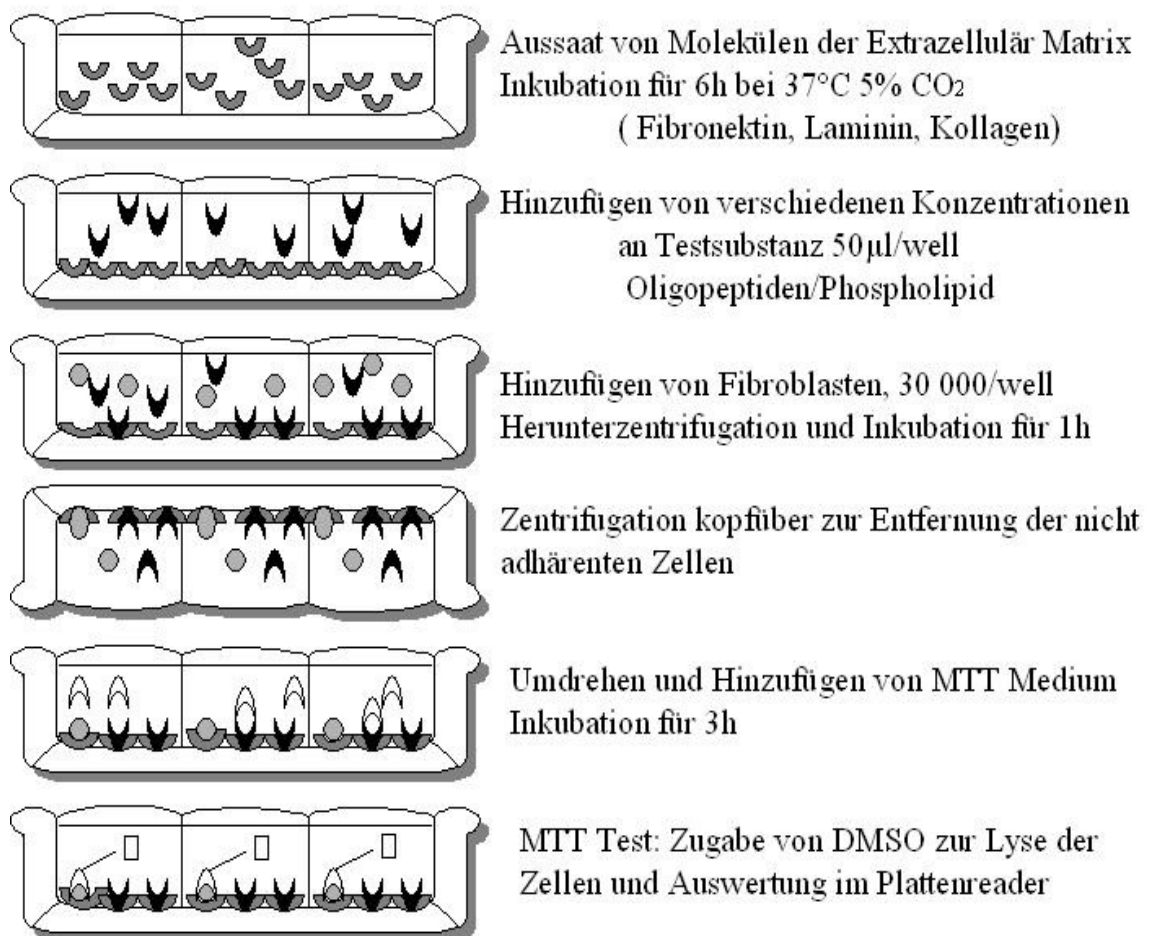
Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte offen in ein PBS-Bad getaucht, unter PBS mit einer selbstklebenden Folie abgeklebt und mit dem Deckel wieder verschlossen. Nun konnte die Mikrotiterplatte, nach vollständiger Abdichtung mit Parafilm, umgedreht werden.

Die nächsten Versuchsschritte erfolgten in „Überkopf-Lage“ der Mikrotiterplatten. Auf diese Weise konnten die nicht adhärenen Zellen keinen falsch positiven Befund ergeben. Zur Entfernung der nicht adhärenen Zellen wurde die Platte „Überkopf“ bei 70 g über 5 min zentrifugiert. Noch im umgedrehten Zustand erfolgte nun die Entfernung der Dichtungen und des Deckels. Das Umdrehen der Mikrotiterplatte erfolgte erst nach einmaligem Ausschlagen.

Zur Bestimmung der adhärenenten Zellen wurde pro Napf 100 µl MTT-Medium pipettiert. Nach einer Inkubation über 3 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das MTT Medium entfernt und die Platte ausgeschlagen. Mittels Zugabe von 100 µl DMSO pro Napf und 20 min schütteln wurden die Zellen lysiert und konnten im Plattenreader bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500$ gemessen werden.

Der Versuchsablauf des Zelladhäsionsassays ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

Abb. 5: Schematische Darstellung des Zelladhäsionsassay.



Alle Ansätze wurden in Triplets durchgeführt. Je Triplet wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und die Werte anschließend graphisch dargestellt.

Material *Pipetten* (EPPENDORF, Hamburg, Germany). *Pipetten Tips* (AHN Biotechnologie, Nordhausen, Germany). *Mikrotiterplatten* (SARSTEDT, Nürnbrecht, Germany). *Kollagen* (BACHEM, Heidelberg, Germany). *Laminin* (BACHEM, Heidelberg, Germany). *Fibronectin* (BACHEM, Heidelberg, Germany). *Zentrifugenröhrchen* 50ml und 15ml (Falcon tubes,

GREINER, Frickenhausen, Germany). **RPMI 1640** (Rosewell Park Memorial Institut Kulturmedium; BIOCHROM, Berlin, Germany) wurde als Trockensubstanz ($10,41 \text{ gr l}^{-1}$) und NaHCO_3 (2 gr l^{-1}) mit aqua ad injectabilia hergestellt, auf pH 7,2 bei 280-290 osm eingestellt und bei 4°C gelagert. **Rxx10+** RPMI 1640 Medium mit 10% inaktiviertem FCS, 1% 200mM L-Glutamin (INVITROGEN/GIBCO, Eggenstein, Germany), 1% 100mM Natriumpyruvat (BIOCHROM, Berlin, Germany) und 1% Antibiotika Stammlösung: Penicillin (500E ml^{-1}) /Streptomycin ($500\mu\text{g ml}^{-1}$) in physiologischer Kochsalzlösung, 0,9% NaCl, (BIOCHROM, Berlin, Germany). **PBS** (BIOCHROM, Berlin, Germany) wurde als Trockensubstanz (NaCl , KCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, K_2PO_4) in 1000ml aqua ad injectabilia gelöst, auf pH 7,2 eingestellt und bei 4°C gelagert. **Parafilm Folie "M"** **Laboratory Film** (AMERICAN NATIONAL CAN, Chicago, IL, USA) **MTT-Medium** (SIGMA, Deisenhofen, Germany) **DMSO** (SIGMA, Deisenhofen, Germany) **Plattenreader** Photometer Boehringer, Typ Anthos Reader 2001, (BOEHRINGER, Mannheim, Germany)

2.3 Peritoneale Adhäsion

Die Fähigkeit von spezifischen Oligopeptiden, im Vergleich zu Phospholipid peritoneale Adhäsionen zu vermeiden, wurde in einem in vivo Modell getestet.

2.3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden insgesamt 45 weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57/BL6 (CHARLES RIVER DEUTSCHLAND, SULZFELD, GERMANY) verwendet. Die Mäuse im Alter von 6-8 Wochen hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von 17,6 gr (SD 0,8). Die Tiere wurden in der konventionellen Kleintierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck in Polycarbonatkäfigen mit einer Größe von 38×22×15 cm auf Weichholzgranulat gehalten. Die Anzahl der Mäuse pro Käfig wurde auf fünf Tiere beschränkt, um Aggressionsverhalten zu reduzieren. Die Tiere wurden kontinuierlich mit einer pelletierten Standarddiät für Mäuse gefüttert und erhielten Leitungswasser ad libidum über Tränkeflaschen. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von $19 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und einem Belichtungszyklus von 6⁰⁰-18⁰⁰ Uhr gehalten. Gemäß dem Tierschutzgesetz wurden alle tierexperimentellen Untersuchungen der Dissertationsarbeit vom Ministerium für Umweltschutz, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein als zuständiger Behörde genehmigt (Versuchsantragsnummer V252 72241.122 8 (61/02) vom 18.12.01, Versuchsnummer gemeinsame Tierhaltung 25/2a/02).

Material *Polycarbonatkäfige Typ III (MAKROLON®, Germany). Weichholzgranulat (ALTROMIN, Lage, Germany). Standarddiät (ALTROMIN, Lage, Germany) für Mäuse, darin enthalten sind Rohprotein 19,0%, Rohfett 4,0%, Rohfaser 6,0%, Rohasche 7,0%, Calcium 0,9%, sowie Phosphor 0,7%. Als Zusatzstoffe sind 15000 IE Vitamin A, 600 IE Vitamin D₃, 75 mg Vitamin E und 5 mg Kupfer je Kilogramm Futtermittel enthalten.*

2.3.2 Anästhesie

Als Injektionsnarkotikum wurde das Barbiturat Präparat Nembutal® verwendet. Den Mäusen wurde eine intraperitoneale Barbituratinjektion, in einer gewichtsorientierten Dosierung von 0,06 mg gr⁻¹ Körpergewicht, verabreicht. Zur Injektion wurden die Mäuse mit Daumen, Zeige- und Mittelfinger an einer Hautfalte im Nacken gefasst. Um

Verletzungen von Darmschlingen, Leber und Leistengefäßen zu vermeiden, wurde den Mäusen das Narkotikum im medialen Bereich des unteren Abdomens in Kopftieflagerung intraperitoneal injiziert. Die Wirkungsdauer des Barbiturats bis zum vollständigen Erwachen und Bewegungen der Mäuse dauerte durchschnittlich 3 h. Vereinzelt konnte mit der Initialdosis nicht die gewünschte Narkosedauer und Narkosetiefe erreicht werden, so dass in diesen Fällen ein Drittel der Initialdosierung des Barbiturats intraperitoneal nachinjiziert wurde. Nach Wirkungsbeginn des Barbiturats wurden die Mäuse auf den Rücken gelagert, da in dieser Position die Atmung weniger beeinträchtigt wurde und außerdem eine bessere Überwachung der Vitalfunktionen möglich war.

Material **Nembutal** Wirkstoff Natrium-Pentobarbital (SANOFI CEVA, Vertrieb: Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, HANNOVER, GERMANY) Die Pentobarbitallösung mit einem Wirkstoffgehalt von 60 mg ml^{-1} wurde mit Wasser für Injektionszwecke (BRAUN, MELSUNGEN, GERMANY) auf eine Konzentration von 6 mg ml^{-1} Pentobarbital verdünnt. **Injektionsnadeln** (BRAUN, MELSUNGEN, GERMANY) zur intraperitonealen Barbituratapplikation wurden Injektionsnadeln vom Typ Sterican® mit einer Länge von 12 mm bei einem Außendurchmesser von 0,45 mm (26G) eingesetzt. **Feindosierungsspritzen** vom Typ Omnifix®-F 1ml (BRAUN, MELSUNGEN, GERMANY) wurden zur Applikation des Injektionsnarkotikums verwendet. Durch die Graduierung der Spritzen war es möglich, Volumina auf 0,01 ml genau zu dosieren.

2.3.3 Rasur und Desinfektion

Um Wundheilungsstörungen und Hautinfektionen der Laparotomienarbe zu vermeiden, wurden die Mäuse nach Narkoseeintritt mit Hilfe eines Bartschneiders am Bauch rasiert. Zur Schaffung einer geeigneten Kontaktstelle für die Neutralelektrode des Koagulationsgerätes wurde folgend ein etwa 1 cm^2 großes Areal auf dem Rücken der Mäuse rasiert. Durch behutsames Vorgehen konnten dabei Hautverletzungen der Tiere vermieden werden. Um einen optimalen Kontakt zwischen dem rasierten Hautareal auf dem Rücken der Mäuse und der Neutralelektrode des Diathermiegerätes herzustellen, wurde EKG-Elektrodengel eingesetzt. Die narkotisierten Mäuse wurden mit dem

rasierten Hautareal des Rückens auf die Neutralelektrode des Koagulationsgerätes gelegt. Das Operationsgebiet wurde mit Cutasept® desinfiziert.



Abb. 6: Maus nach Rasur und Desinfektion

Material *Bartschneider Philips Zoom Trimmer HS (WARTER, Lübeck, Germany). EKG-Elektrodengel (TÜSHAUS GMBH, Velen-Ramsdorf, Germany). Neutralelektrode Klebeelektrode der Marke Europlate® Typ 447 (DAHLHAUSEN, KÖLN, GERMANY). Cutasept (BODE CHEMIE, Hamburg, Germany)*

2.3.4 Laparotomie

Nach Inzision der Haut mit einer Schere erfolgte die Medianlaparotomie unter Schonung des Peritoneums. Erst mit einem zweiten Schnitt wurde das Peritoneum vom Sternum bis oberhalb der Symphyse eröffnet.



Abb. 7: Maus nach Laparotomie

Material *Operationsbesteck* bestehend aus mehreren feinen Scheren, einer chirurgischen und einer anatomischen Pinzette, allesamt zuvor sterilisiert (AESKULAP, BMTL, Lübeck, Germany).

2.3.5 Setzen der peritonealen Läsion

Die peritoneale Läsion wurde mittels einer bereits 1996 von Saltzman et al. beschriebenen operativen Technik in standardisierter, gleicher Weise gesetzt (Saltzman et al., 1996). In seinen Kontrollversuchen konnte Saltzman bei über 90 % der Tiere peritoneale Adhäsionen auslösen.

Zur Auslösung peritonealer Adhäsionen erfolgte zunächst die Setzung einer Koagulationsnarbe am parietalen Peritoneum, lateral der Medianlaparotomie. Hierzu wurde über 3 Sekunden mit einem Hochfrequenzdiathermiegerät auf niedrigster Stufe auf einem Areal von 1 mm² koaguliert. Anschließend wurde mit der anatomischen Pinzette das Zöekum dargestellt, mobilisiert und einem Tupfer 20-fach abgestrichen. Der gesamte Eingriff erfolgte unter einer Reinraumwerkbank mit steriler Dunstabzugshaube.



Abb. 8: Koagulationsstelle an der lateralen Laparotomiestelle

Material *Reinraumwerkbank* Envircom, CEAG SCHIRP, Reinraumtechnik, BORK, Germany
Hochfrequenzdiathermiegerät Typ Elektrotom 500 / Modulsystem 2000 (GEBRÜDER MARTIN, Tuttlingen, Germany).

2.3.6 Bauchspülung und Applikation von Testsubstanzen

Im Anschluss an die Serosaschädigung erfolgte eine ausgiebige Bauchspülung mit jeweils 1 ml Spüllösung für 1 Minute. Zur Verminderung der Adhäsionen wurden unterschiedliche Agenzien, Spüllösungen, eingesetzt. Als Kontrolle wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Als Therapiekontrolle wurde Phospholipid, ein klinisch etabliertes Mittel zur Adhäsionsprophylaxe eingesetzt. Die zu untersuchenden Testsubstanzen waren kombinierte klassische Oligopeptide und kombinierte modifizierte Oligopeptide. Die Testsubstanzen wurden in die Bauchhöhle gespritzt und das Peritoneum wurde durch vorsichtiges Drücken an die seitliche Bauchwand durchgespült.

Material: **NaCl 0,9%** (BIOCHROM, Berlin, Germany) **Phospholipid** Liposome Solution 1,5% (FRESENIUS KABI, Bad Homburg, Germany) **Oligopeptide** GRGDS, EILDV, KQAGDV (BACHEM, Heidelberg, Germany) jeweils 3mg/ml NaCl 0,9%; **modOligopeptide** modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV (BACHEM, Heidelberg, Germany) jeweils 3mg/ml NaCl 0,9%

2.3.7 Einteilung der Versuchsansätze

Aufgrund der Komplexität der Versuchsdurchführung wurden die Tierversuche in drei Teilabschnitten durchgeführt. Im ersten Versuchsabschnitt wurden alle zu untersuchenden Substanzen eingesetzt, in den folgenden Versuchsansätzen wurden einzelne Therapieansätze gegen die Negativkontrolle, Kochsalzspülung, getestet.

Im ersten Versuchsansatz wurden entsprechend insgesamt 21 Tiere behandelt. 6 Tiere wurden in der Kontrollgruppe mit NaCl 0,9 % gespült. 3 Tiere wurden in der Therapiekontrollgruppe mit Phospholipid gespült. 6 Tiere wurden mit Oligopeptiden, 6 Tiere mit modifizierten Oligopeptiden gespült.

Im zweiten Versuchsansatz, Oligopeptidspülung, wurden 14 Tiere behandelt. In der Kontrollgruppe wurden 6 Tiere mit NaCl 0,9% gespült. 4 Tiere wurden mit klassischen Oligopeptiden gespült und 4 Tiere mit modifizierten Oligopeptiden.

Im dritten Versuchsansatz, Phospholipidspülung, wurden 10 Tiere behandelt. In der Kontrollgruppe wurden 5 Tiere mit NaCl 0,9% gespült, 5 Tiere wurden mit Phospholipid gespült.

2.3.8 Wundverschluss

Zum Abschluss erfolgte der Wundverschluss mittels mehrschichtiger Einzelknopfnahrt des Peritoneums und der Faszie. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls mit Einzelknopfnähten. Es wurde ein resorbierbarer Faden, 3/0 Vicryl, verwandt.



Abb. 9: Wundverschluss der Laparotomie

Material: *Vicryl 3/0 RB-1 Plus (ETHICON, Norderstedt, Germany)*

2.3.9 Opferung der Mäuse

Nach einem Zeitraum von 14 Tagen nach Laparotomie wurden die Mäuse getötet. Die Tötung der Mäuse erfolgte mit Hilfe von Kohlendioxid. Hierzu wurden die Mäuse in einen speziellen Käfig gebracht, der dann für etwa 3 Minuten mit CO₂ begast wurde. In diesem Käfig wurden die Mäuse bis zum Eintritt sicherer Todeszeichen belassen.

Material *Präparierkasten Aesculap / Inox (BMTL, LÜBECK, GERMANY)* *Einmalskalpelle Feather (FIRMA PFM, KÖLN, GERMANY)*

2.3.10 Sektion

Die Sektion der Mäuse erfolgte unmittelbar nach der Opferung. Bei Mäusen, die vor Ablauf des Experiments verstarben, wurde die Sektion direkt nach dem Auffinden des toten Tieres durchgeführt. Zur Sektion wurde zunächst ein Längsschnitt von Symphyse bis Sternum vorgenommen. Anschließend wurde das parietale Peritoneum dargestellt und eröffnet. Das Ausmaß der Adhäsionen wurde begutachtet und photographisch

festgehalten. Die Adhäsionen wurden eingeteilt auf einer Skala mit Graduierung von 0 bis 3. Keine Adhäsionen wurden mit 0 bewertet, oberflächliche Adhäsionen mit 1, fibröse Adhäsionen mit 2 und multiple Adhäsionen oder Briden mit 3.

Tab. 3: Skala zur Einteilung der Adhäsionen (Modifiziert nach Saltzman et al. 1996)

Adhäsionsausdehnung	Skala / Grad
Keine Adhäsionen	0
Oberflächliche Adhäsionen	1
Fibröse Adhäsionen	2
Multiple Adhäsionen, Bridenileus	3

Material *Nikon Coolpix 5000 Digitalkamera 5,0 MegaPixel mit integrierten Blitzgerät*

2.4 Statistik

Zur Auswahl geeigneter statistischer Testverfahren wurde die Beratung des Instituts für Medizinische Statistik und Dokumentation in Anspruch genommen. Die Analyse der Ausdehnung der Adhäsionen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U Test. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant festgelegt. Die Gesamtauswertung wurde als Boxplot-Diagramm wiedergegeben.

Material *Zur statistischen Analyse wurde das Programm SPSS® für Windows® verwendet.*

III Ergebnisse

3.1 Adhäsionsinhibition in vitro

Die Adhäsion von Zellen an Moleküle der Extrazellulärmatrix ist ein Prozess, der durch die Interaktion dieser Moleküle mit Adhäsionsrezeptoren auf der Zelloberfläche vermittelt wird. Die Adhäsion von Endothelzellen an eine provisorische Matrix wie Fibronectin, Laminin und Kollagen ist einer der grundlegenden Schritte für die Entstehung von peritonealen Adhäsionen.

Das eingesetzte Oligopeptid GRGDS, mit der kleinsten funktionellen Aminosäuresequenz RGD, stellt die Bindungsstelle der Integrine zu Fibronectin dar, EILDV jene für Laminin und Fibronectin und KQAGDV für Kollagen. Die einzelnen Oligopeptide wurden jeweils auch in modifizierter Form eingesetzt. Modifiziertes GRGDS wurde als Inhibitor der Adhäsion zu Fibronectin, modifiziertes EILDV als Inhibitor zu Fibronectin und Laminin und modifiziertes KQAGDV respektive zu Kollagen eingesetzt.

Mittels Zelladhäsionsassay wurde die Fähigkeit der Adhäsionsinhibition durch die verschiedenen Oligopeptide zwischen Mäusefibroblasten und Molekülen der Extrazellulärmatrix untersucht. Zum Einsatz kamen hier die Extrazellulärmatrix-Moleküle Fibronectin, Laminin und Kollagen. Getestet wurde die Adhäsion an das einzelne Matrixmolekül Fibronectin und an eine Kombination von Matrixmolekülen (Mischmatrix) mit Fibronectin, Laminin und Kollagen.

Als Peptidkontrolle diente Angiotensin, ein Gewebshormon mit Polypeptidstruktur und blutdrucksteigernder Wirkung. Angiotensin besitzt keine Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition und stellt daher ein optimales Kontrollpeptid dar. Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten unbehandelt eingesetzt. Die erzielte Adhäsion wurde relativ als 100 % eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden keine Zellen eingesetzt (Leermedium). Der ermittelte Extinktionswert wurde von jedem anderen erzielten Extinktionswert der Kontrollen und der zu untersuchenden Substanzen abgezogen.

3.1.1 Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Fibronectin

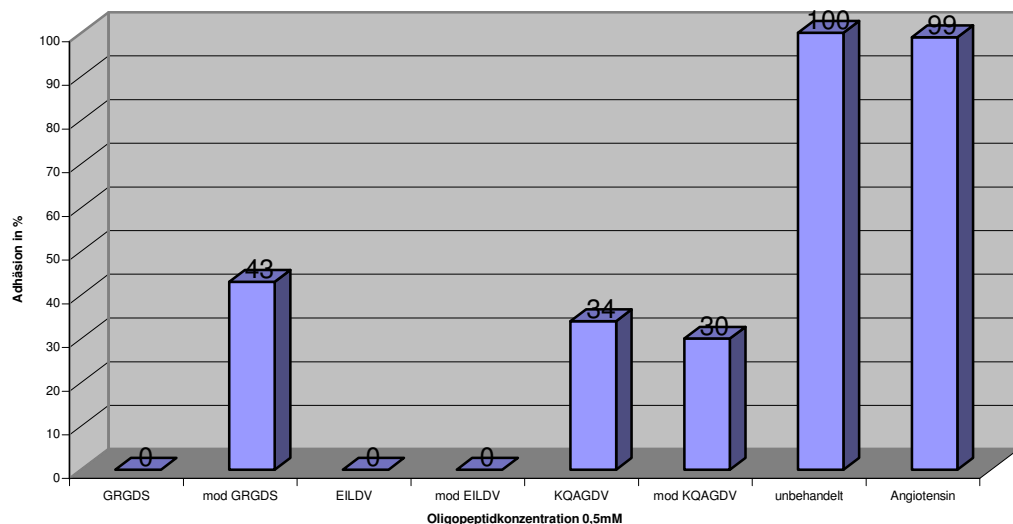
Die verschiedenen Oligopeptide wurden im Zelladhäsionsassay zur Adhäsionsinhibition von Mausfibroblasten (NIH/3T3) an Fibronectin getestet. Die Oligopeptide wurden jeweils in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 und in Abbildung 10 dargestellt.

Tab. 4: Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Fibronectin durch Oligopeptide

Leermedium	unbehandelt	Angiotensin	GRGDS	EILDV	modGRGDS	modEILDV	KQAGDV	modKQAGDV
0,164		0,395	0,000	0,000	0,179	0,000	0,152	0,137
0,052		0,368	0,000	0,000	0,163	0,000	0,145	0,124
	0,428	0,424	0,000	0,000	0,189	0,000	0,160	0,125
	0,414	0,402	0,000	0,000	0,157	0,000	0,181	0,118
	0,401	0,415	0,000	0,000	0,186	0,000	0,126	0,123
	0,434	0,430	0,000	0,000	0,150	0,000	0,134	0,140
	0,413	0,410	0,000	0,000	0,204	0,000	0,128	0,137
	0,411	0,426	0,000	0,000	0,161	0,000	0,141	0,113
	0,420	0,406	0,000	0,000	0,184	0,000	0,129	0,139
	0,415	0,397	0,000	0,000	0,184	0,000	0,119	0,110
	0,423	0,463	0,000	0,000	0,177	0,000	0,170	0,137
	0,406	0,401	0,000	0,000	0,193	0,000	0,112	0,109
Mittelwert	0,417	0,411	0,000	0,000	0,177	0,000	0,141	0,126
SD	0,009	0,022	0,000	0,000	0,016	0,000	0,020	0,011
Adhäsion in %	100	99	0	0	43	0	34	30
Verminderung der Adhäsion in %		1	100	100	57	100	66	70

MTT Test. Angegeben ist jeweils der Extinktionswert. SD=Standardabweichung. Beschichtung mit Fibronectin $30\mu\text{g ml}^{-1}$; Mausfibroblasten NIH/3T3 $6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$; Oligopeptide $500\mu\text{M}$; Angiotensin 1mM

Abb.10: Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin Inhibition durch Oligopeptide



Die Peptidkontrolle mit Angiotensin konnte im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten die Adhäsion an Fibronectin nicht inhibieren. Eine vollständige Inhibition

der Adhäsion konnte durch den Einsatz von 0,5 mM GRGDS, EILDV und modifiziertem EILDV erzielt werden. Der Einsatz von modifizierten GRGDS konnte die Adhäsion von Mäusefibroblasten an Fibronectin um 57 % inhibieren. Die Inhibition war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Der Einsatz von 0,5 mM KQAGDV wie auch der Einsatz von modifiziertem KQAGDV verminderte die Adhäsion signifikant um 66 %, respektive um 70 %.

3.1.2 Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Mischmatrix durch Oligopeptide

Der Zelladhäsionsassay wurde in den folgenden Versuchen mit einer Mischmatrix durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und Abbildung 11 dargestellt.

Tab. 5: Adhäsionsinhibition von Mäusefibroblasten an Mischmatrix durch Oligopeptide

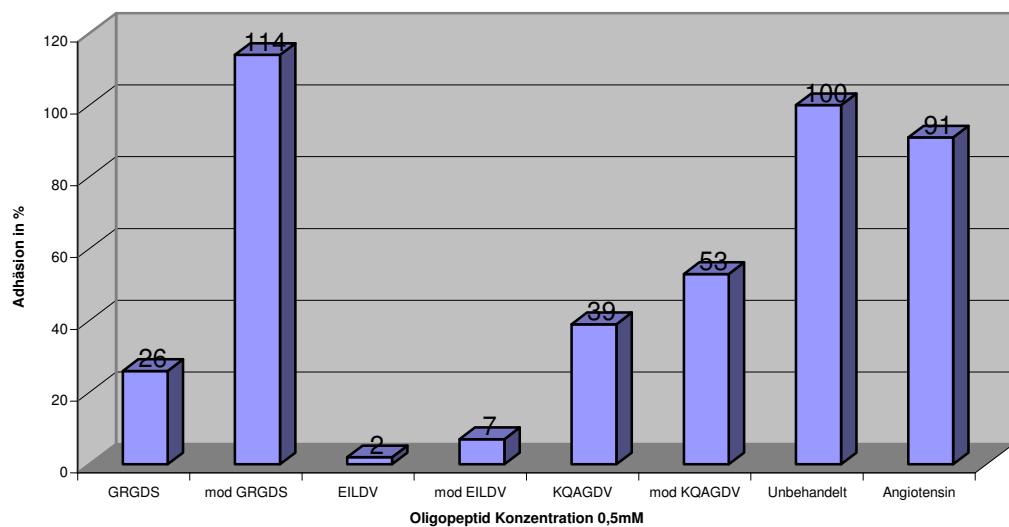
Leermedium	unbehandelt	Angiotensin	GRGDS	Mod GRGDS	EILDV	Mod EILDV	KQAGDV	Mod KQAGDV
0,054	0,266	0,135	0,063	0,329	0,008	0,018	0,086	0,124
0,051	0,256	0,118	0,072	0,276	0,003	0,018	0,097	0,124
	0,254	0,109	0,057	0,300	0,000	0,010	0,111	0,149
	0,277	0,253	0,064	0,242	0,000	0,022	0,096	0,148
	0,114	0,250	0,068	0,370	0,002	0,010	0,103	0,123
	0,129	0,255	0,059	0,321	0,005	0,010	0,052	0,136
	0,282	0,221	0,046	0,278	0,007	0,022	0,095	0,112
	0,267	0,277	0,064	0,254	0,007	0,017	0,111	0,115
	0,261	0,245	0,065	0,278	0,005	0,018	0,090	0,118
	0,274	0,253	0,066	0,215	0,001	0,020	0,086	0,134
	0,256	0,250	0,068	0,227	0,003	0,011	0,104	0,139
	0,259	0,257	0,058	0,214	0,004	0,020	0,100	0,116
Mittelwert	0,241	0,219	0,063	0,275	0,004	0,016	0,094	0,128
SD	0,054	0,058	0,007	0,048	0,003	0,005	0,015	0,012
Adhäsion in %	100	91	26	114	2	7	39	53
Verminderung der Adhäsion in %		9	74	-14	98	93	61	47

MTT Test. Angegeben ist jeweils der Extinktionswert. SD=Standardabweichung. Beschichtung mit Fibronectin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Laminin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und Kollagen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; Mäusefibroblasten NIH/3T3 $6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$; Oligopeptide 500 μM , Angiotensin 1 mM

Keine signifikante Adhäsionsinhibition wurde durch die Peptidkontrolle mit Angiotensin erzielt. Die Extinktion wurde um lediglich 9 % vermindert. Die Adhäsion von Fibroblasten an die Mischmatrix konnte durch den Einsatz von 0,5 mM GRGDS signifikant inhibiert werden ($p < 0,001$). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen

wurde die Adhäsion an die Mischmatrix um 74 % inhibiert ($p < 0,001$). Durch Einsatz von EILDV sowie von modifiziertem EILDV zeigte sich ebenfalls eine signifikante Inhibition der Adhäsion von 98 % respektive 93 % ($p < 0,001$). Durch die Oligopeptide KQAGDV und modifiziertes KQAGDV konnte eine Adhäsionsinhibition um 61 % und respektive 47 % erzielt werden. Auch diese Inhibition der Fibroblastenadhäsion an die Mischmatrix war signifikant für KQAGDV ($p < 0,001$) wie auch für modifiziertes KQAGDV ($p = 0,001$). Durch den Einsatz von modifiziertem GRGDS konnte keine signifikante Inhibition ($p = 0,291$) der Adhäsion an Mischmatrix erreicht werden.

Abb.11: Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix Inhibition durch Oligopeptide



3.1.3 Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Mischmatrix durch Phospholipid

Die Fähigkeit der integrinspezifischen Oligopeptide zur Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Moleküle der Extrazellulärmatrix im Vergleich mit kommerziell erhältlichen Phospholipiden wurde im folgenden getestet. Phospholipide werden prophylaktisch zur Verminderung postoperativer peritonealer Adhäsionen eingesetzt. Bei klinischer Anwendung werden Phospholipide in einer 0,75 %-igen Lösung eingesetzt. Die Phospholipide wurden im Zelladhäsionsassay in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (0,75 %; 0,075 % und 0,0075 %).

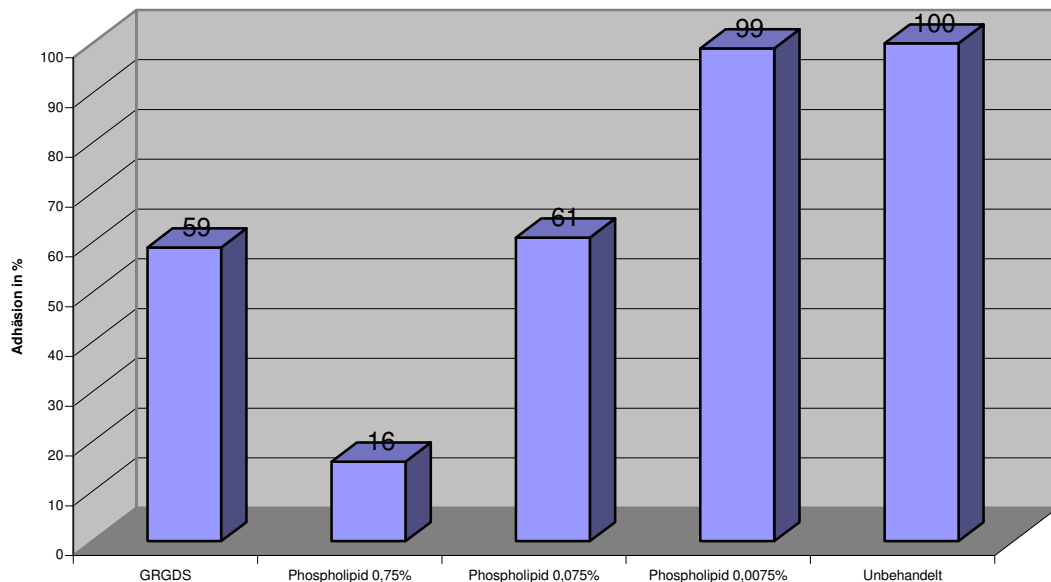
Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 12 dargestellt.

Tab. 6: Adhäsionsinhibition von Mäusefibroblasten an Mischmatrix durch Phospholipid

Leermedium	unbehandelt	GRGDS	Phospholipid 0,75%	Phospholipid 0,075%	Phospholipid 0,0075%
0,068		0,043	0,017	0,043	0,077
0,052		0,044	0,010	0,039	0,077
	0,075	0,039	0,014	0,044	0,063
	0,076	0,046	0,010	0,050	0,072
	0,067	0,035	0,007	0,040	0,066
	0,071	0,033	0,011	0,048	0,066
	0,074	0,039	0,006	0,040	0,076
	0,076	0,031	0,016	0,043	0,077
	0,077	0,052	0,017	0,046	0,072
	0,066	0,049	0,016	0,043	0,073
	0,066	0,049	0,003	0,043	0,070
	0,076	0,049	0,012	0,049	0,074
Mittelwert	0,072	0,042	0,012	0,044	0,072
SD	0,004	0,007	0,004	0,003	0,005
Adhäsion in %	100	59	16	61	99
Verminderung Adhäsion in %		41	84	39	1

MTT Test. Angegeben ist jeweils der Extinktionswert. SD=Standardabweichung. Beschichtung mit Fibronectin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Laminin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und Kollagen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; Mäusefibroblasten NIH/3T3 $6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$; GRGDS $500 \mu\text{M}$

Abb.12: Adhäsion von Mäusefibroblasten an Mischmatrix Inhibition durch Phospholipid



Das zur Kontrolle untersuchte integrinspezifische Oligopeptid GRGDS konnte die Adhäsion signifikant um 41 % vermindern ($p < 0,001$). Das Phospholipid verminderte die Adhäsion von Mäusefibroblasten an Mischmatrix konzentrationsabhängig. Bei Einsatz

einer 0,75 %-igen Lösung Phospholipid wurde die Adhäsion signifikant um 84 % vermindert ($p < 0,001$). Der Einsatz einer 0,075 %-igen Lösung des Phospholipids konnte die Adhäsion ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) um 39 % reduzieren. Bei Einsatz einer 0,0075%-igen Phospholipid Lösung konnte keine Verminderung der Adhäsion gemessen werden ($p = 0,872$).

3.1.4 Adhäsionsinhibition durch kombinierte Oligopeptide

Zur Optimierung der Adhäsionsinhibition von Mausfibroblasten an Moleküle der Extrazellulärmatrix wurden die Oligopeptide in Kombination eingesetzt. Eingesetzt wurden Kombinationen der klassischen und der modifizierten Oligopeptide in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 und 8 und in Abbildung 13 dargestellt.

Tab. 7: Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Mischmatrix durch kombinierte Oligopeptide

Leermedium	unbehandelt	Oligopeptide 0,1mM	Oligopeptide 0,5mM	Oligopeptide 1mM	GRGDS 0,5mM	Angiotensin 0,5mM
0,054		0,304	0,066	0,017	0,273	0,355
0,054		0,276	0,092	0,029	0,240	0,315
	0,315	0,314	0,086	0,020	0,313	0,323
	0,329	0,284	0,086	0,024	0,288	0,334
	0,308	0,322	0,065	0,025	0,318	0,306
	0,321	0,325	0,081	0,023	0,282	0,341
	0,315	0,281	0,081	0,026	0,316	0,349
	0,305	0,289	0,074	0,026	0,304	0,330
	0,347	0,340	0,081	0,020	0,256	0,331
	0,324	0,329	0,078	0,014	0,293	0,338
	0,329	0,342	0,073	0,020	0,312	0,319
	0,335	0,285		0,020	0,289	0,317
Mittelwert	0,323	0,308	0,078	0,022	0,290	0,330
SD	0,012	0,023	0,008	0,004	0,024	0,014
Adhäsion in %	100	95	24	7	90	102
Verminderung Adhäsion in %		5	76	93	10	-2

MTT Test. Dargestellt ist jeweils der Extinktionswert. SD=Standardabweichung. Beschichtung mit Fibronectin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Laminin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und Kollagen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; Mausfibroblasten NIH/3T3 $6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$

Zunächst erfolgte die Untersuchung der klassischen Oligopeptide im Zelladhäsionsassay. Die durchgeführten Peptidkontrollen mit Angiotensin konnten keine signifikante Verminderung der Adhäsion erzielen ($p = 0,228$). Das als

Positivkontrolle eingesetzte Oligopeptid GRGDS 0,5 mM konnte signifikant die Adhäsion vermindern ($p=0,001$). Bei Einsatz einer Kombination von GRGDS, EILDV und KQAGDV in einer Konzentration von 0,1 mM konnte keine signifikante Adhäsionsinhibition erzielt werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen konnten nur 5 % der Fibroblasten an der Adhäsion an die Mischmatrix gehindert werden ($p=0,159$). Der Einsatz einer 0,5 mM Lösung der kombinierten Oligopeptide GRGDS, EILDV und KQAGDV konnte die Adhäsion der Mausfibroblasten an Mischmatrix hingegen um 76 % vermindern ($p<0,001$). Eine Konzentrationserhöhung der Oligopeptidkombination auf eine 1 mM Lösung konnte die Adhäsion der Fibroblasten an Mischmatrix im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten signifikant um 93 % herabsetzen ($p<0,001$).

Die modifizierten Oligopeptide wurden in Kombination und in unterschiedlichen Konzentrationen im Zelladhäsionsassay im Vergleich mit unbehandelten Zellen und Peptidkontrolle eingesetzt.

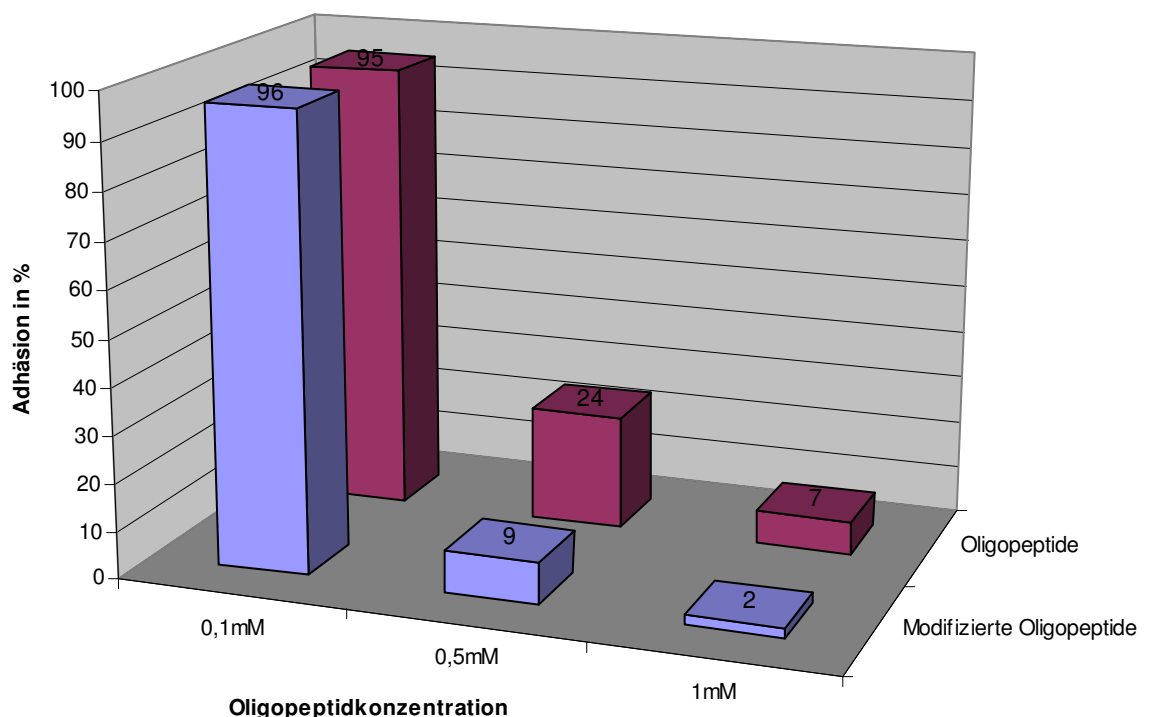
Tab. 8: Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Mischmatrix durch kombinierte modifizierte Oligopeptide

Leermedium	unbehandelt	modifizierte Oligopeptide 0,1mM	modifizierte Oligopeptide 0,5mM	modifizierte Oligopeptide 1mM	GRGDS 0,5mM	Angiotensin 0,5 mM
0,062		0,297	0,023	0,007	0,218	0,294
0,054		0,296	0,031	0,007	0,220	0,306
	0,311	0,288	0,022	0,007	0,218	0,295
	0,282	0,314	0,028	0,005	0,234	0,316
	0,328	0,278	0,038	0,005	0,227	0,336
	0,290	0,283	0,026	0,008	0,199	0,292
	0,331	0,302	0,029	0,003	0,251	0,275
	0,306	0,320	0,023	0,001	0,201	0,309
	0,316	0,290	0,021	0,005	0,253	0,301
	0,322	0,306	0,028	0,007	0,260	0,307
	0,315	0,313	0,030	0,000	0,255	0,306
	0,327	0,317	0,032	0,002	0,258	0,330
Mittelwert	0,313	0,300	0,028	0,005	0,233	0,306
SD	0,015	0,013	0,005	0,003	0,021	0,016
Adhäsion in %	100	96	9	2	74	98
Verminderung Adhäsion %		4	91	98	26	2

MTT Test. Angegeben ist jeweils der Extinktionswert. SD=Standardabweichung. Beschichtung mit Fibronectin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, Laminin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und Kollagen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$; Mausfibroblasten NIH/3T3 $6 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$

Die Peptidkontrolle mit Angiotensin ergab keine signifikante Inhibition ($p=0,283$) der Adhäsion bei einer Verminderung um 2 %. Das vergleichend eingesetzte einzelne Oligopeptid GRGDS in einer Konzentration von 0,5 mM verminderte die Adhäsion signifikant um 26 % ($p<0,001$). Bei Einsatz einer 0,1 mM Lösung mit modifiziertem GRGDS, modifiziertem EILDV und modifiziertem KQAGDV konnte die Adhäsion der Mausfibroblasten im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten nur gering um 4 % vermindert werden. Dies entspricht keiner signifikanten Verminderung der Adhäsion ($p=0,069$). Bei einer Konzentrationserhöhung der kombinierten modifizierten Oligopeptide auf eine 0,5 mM Lösung wurden im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten 91 % der Mausfibroblasten an der Adhäsion gehindert. Dies entspricht einer signifikanten Verminderung der Adhäsion ($p<0,001$). Der Einsatz von modifizierten Oligopeptiden in einer Konzentration von 1 mM konnte die Adhäsion der Fibroblasten ebenfalls signifikant um 98 % inhibieren ($p<0,001$). Zwischen den Kombinationen der klassischen und modifizierten Oligopeptide zeigte sich kein signifikanter Wirkungsunterschied.

Abb.13: Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix Inhibition durch kombinierte modifizierte und klassische Oligopeptide



Eingesetzt wurden Kombinationen der klassischen Oligopeptide (GRGDS, EILDV, KQAGDV) sowie der modifizierten Oligopeptide (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV) in den Konzentrationen 0,1mM, 0,5mM und 1mM.

3.1.5 Zusammenfassung Adhäsionsinhibition in vitro

Zusammengefasst konnten die integrinspezifischen Oligopeptide im Rahmen eines Zelladhäsionsassays die Bindung zwischen Fibroblasten und Molekülen der Extrazellulärmatrix inhibieren. Der Einsatz einer Peptidkontrolle mit Angiotensin konnte in keinem Versuchsansatz eine Verminderung der Adhäsion der Fibroblasten an Moleküle der Extrazellulärmatrix erzielen. Einzeln eingesetzt konnten alle Oligopeptide und alle modifizierten Oligopeptide die Adhäsion von Mausfibroblasten an einen Monolayer mit Fibronectin im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten signifikant inhibieren ($p < 0,001$).

Das Ausmaß der Adhäsionsinhibition von Fibroblasten an Fibronectin bei Einsatz der verschiedenen Oligopeptide war unterschiedlich. Mit den integrinspezifischen Oligopeptiden GRGDS, EILDV und modifiziertem EILDV konnten die Adhäsionen im Gegensatz zur Adhäsion von unbehandelten Fibroblasten vollständig inhibiert werden. Die Oligopeptide KQAGDV, modifiziertes GRGDS und modifiziertes KQAGDV konnten die Adhäsionen signifikant inhibieren ($p < 0,001$).

Die Adhäsion von Fibroblasten an eine Mischmatrix ließ sich durch den Einsatz der unterschiedlichen Oligopeptide ebenfalls signifikant inhibieren. Das Oligopeptid EILDV konnte die Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix vollständig inhibieren. Die Oligopeptide GRGDS, KQAGDV und modifiziertes EILDV konnten die Adhäsion von Fibroblasten im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten signifikant vermindern ($p < 0,001$). Einzig das modifizierte Oligopeptid modGRGDS konnte keine signifikante Verminderung der Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix erzielen ($p = 0,291$). Das im Zelladhäsionsassay eingesetzte Phospholipid konnte ebenfalls signifikant und konzentrationsabhängig die Adhäsion der Fibroblasten an Mischmatrix inhibieren.

Durch Einsatz kombinierter integrinspezifischer Oligopeptide konnte die Adhäsion signifikant und konzentrationsabhängig inhibiert werden. Die kombiniert eingesetzten modifizierten Oligopeptide und die klassischen Oligopeptide zeigten keinen signifikanten Wirkungsunterschied.

3.2 Minimierung peritonealer Adhäsionen nach Serosaschädigung

Die peritoneale Adhäsion nach Serosaschädigung beruht auf fibrinösen Verbindungen, die durch Einwandern von Fibroblasten zu dauerhaften Verbindungen umgewandelt werden. Die hier durchgeführten Versuchsansätze beruhen auf der Hypothese, die Fibroblasteneinwanderung innerhalb der ersten Stunden nach Serosaläsion zu inhibieren, um die peritoneale Adhäsion zu verhindern bzw. zu minimieren. Durch peritoneale Spülung mit spezifischen integrinblockierenden Oligopeptiden soll die Adhärenz zwischen Fibroblasten und der Extrazellulärmatrix blockiert werden.

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte in drei Teilabschnitten. Im Verlauf der verschiedenen Versuchsansätze starben insgesamt 7 Tiere intraoperativ. Die Tiere wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Eine Ursache der Narkosezwischenfälle konnte nicht gefunden werden.

3.2.1 Adhäsionsinhibition in vivo

Behandelt wurden insgesamt 21 Tiere, fünf Tiere verstarben im Rahmen der Narkose, so dass die Auswertung mit 16 Tieren erfolgte. In der Kontrollgruppe, die mit Kochsalzlösung gespült wurde, zeigten sich bei der täglichen Visite keine Auffälligkeiten. Alle Tiere (n=6) entwickelten Adhäsionen. Die Hälfte (n=3) der Tiere entwickelten multiple Adhäsionen, zwei Mäuse fibröse Adhäsionen und eine Maus oberflächliche Adhäsionen.

In der Versuchsgruppe, die mit kombinierten Oligopeptiden gespült wurde, zeigten sich in den täglichen Visiten keine Auffälligkeiten. Zwei Tiere verstarben im Rahmen der Narkose und wurden nicht ausgewertet. Die Hälfte (n=2) der ausgewerteten Tiere (n=4) entwickelten fibröse Adhäsionen, eine Maus multiple Adhäsionen und eine Maus blieb ohne Adhäsionen.

In der Versuchsgruppe, die mit kombinierten modifizierten Oligopeptiden gespült wurde, wurden sechs Tiere behandelt. Drei Tiere verstarben im Rahmen der Narkose und konnten nicht ausgewertet werden. Die drei ausgewerteten Tiere zeigten in der täglichen Visite keine Auffälligkeiten und entwickelten alle oberflächliche Adhäsionen.

In der Versuchsgruppe, die mit Phospholipid gespült wurde, zeigten die Tiere im Rahmen der täglichen Visite keine Auffälligkeiten. Die Spülung erfolgte bei drei Tieren, alle drei Tiere entwickelten oberflächliche Adhäsionen.

Tabelle 9 stellt den Ausdehnungsscore der Adhäsionen in den verschiedenen Gruppen dar. Im Anhang werden in den Abb. 15 – 18 für jedes Tier exemplarisch je ein Photo und die Ausdehnung der Adhäsion gezeigt.

Tab. 9: Grad der Adhäsionen nach Adhäsionsinhibition in vivo

	Kochsalz Lösung (n=6)	Phospholipid (n=3)	Kombinierte mod. Oligopeptide (n=3)	Kombinierte Oligopeptide (n=4)
0 = Keine Adhäsion				1
1 = Oberfl. Adhäsionen	1	3	3	
2 = Fibröse Adhäsionen	2			2
3 = Multiple Adhäsionen	3			1

Gruppen: Kontrolle Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), Phospholipid 0,75%, modifizierte Oligopeptide kombiniert (GRGDS, EILDV, KQAGDV je 3mg/ml NaCl 0,9%) und Oligopeptide kombiniert (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV je 3mg/ml NaCl 0,9%).

3.2.2 Adhäsionsinhibition Oligopeptidspülung

Im Tierversuch Oligopeptidspülung wurde bei 14 Tieren die Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition durch Oligopeptide gegen Kochsalzlösung untersucht.

Vorzeitig verstarben drei Tiere. Ein Tier verstarb im Rahmen der Narkose, ein Tier verstarb bei unklarer Genese am siebten postoperativen Tag, ein Tier am vierten postoperativen Tag an einem Platzbauch. Auch bei diesen Tieren erfolgte eine Sektion. Nur die im Rahmen der Narkose verstorbene Maus wurde von der Auswertung geschlossen, 13 Tiere wurden ausgewertet.

In der Kontrollgruppe wurden sechs Tiere mit Kochsalzlösung gespült. Eine Maus verstarb am siebten postoperativen Tag aus unklarer Ursache. Im Rahmen der Sektion konnte keine sichere Ursache für den plötzlichen Tod gesehen werden. Adhäsionen konnten nicht nachgewiesen werden. Die tägliche Visite hatte weder bei diesem Tier, noch bei den anderen Tieren Auffälligkeiten gezeigt. Vier von sechs Tieren entwickelten Adhäsionen (66,7 %). Zwei Mäuse zeigten multiple Adhäsionen, eine Maus fibröse Adhäsionen und eine Maus oberflächliche Adhäsionen.

In der Versuchsgruppe, die mit kombinierten Oligopeptiden behandelt wurde, verstarb am vierten postoperativen Tag eine bis dahin unauffällige Maus an einem Platzbauch. Die durchgeführte Sektion zeigte keine Adhäsionen. Die tägliche Visite zeigte keine

sonstigen Auffälligkeiten. Von den übrigen drei Tieren entwickelten zwei Tiere multiple Adhäsionen und ein Tier blieb ohne Adhäsionen.

In der Versuchsgruppe, die mit modifizierten Oligopeptiden behandelt wurde, verstarb eine Maus im Rahmen der Narkose und wurde nicht ausgewertet. Von den behandelten drei Mäusen zeigte sich in der täglichen Visite keine Auffälligkeit. Alle Tiere (n=3) blieben ohne Adhäsionen.

Tabelle 10 stellt das Ausmaß der Verteilung des Adhäsionsgrades in den einzelnen Gruppen dar. Abb. 19 – 21 zeigen für jedes Tier exemplarisch je ein Photo und die Ausdehnung der Adhäsion.

Tab. 10: Adhäsionsinhibition Oligopeptidspülung

	Kochsalz Lösung (n=6)	Kombinierte modifizierte Oligopeptide (n=3)	Kombinierte Oligopeptide (n=4)
0 = Keine Adhäsion	2	3	2
1 = Oberfl. Adhäsionen	1		
2 = Fibröse Adhäsionen	1		
3 = Multiple Adhäsionen	2		2

Gruppen: Kontrolle Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), modifizierte Oligopeptide kombiniert (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV je 3mg/ml NaCl 0,9%) und Oligopeptide kombiniert (GRGDS, EILDV, KQAGDV je 3mg/ml NaCl 0,9%).

3.2.3 Adhäsionsinhibition Phospholipidspülung

Im Tierversuch „Phospholipidspülung“ wurde bei 10 Tieren die Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition durch Phospholipide gegen Kochsalzlösung untersucht. Ein Tier verstarb im Rahmen der Narkose und wurde nicht ausgewertet. Ein Tier verstarb am siebten postoperativen Tag an einem Platzbauch, dieses Tier zeigte bei der Sektion keine Adhäsionen. Ein Tier weiteres verstarb am siebten postoperativen Tag unklarer Genese, Adhäsionen konnten nicht nachgewiesen werden.

In der Kontrollgruppe entwickelten alle fünf mit Kochsalzlösung gespülten Tiere Adhäsionen. Eine Maus verstarb am sechsten postoperativen Tag. Die durchgeführte Sektion zeigte als eindeutige Todesursache einen Bridenileus. Der Ausdehnungsscore der Adhäsion wurde mit drei, als multiple Adhäsion, eingeordnet. Die übrigen vier Mäuse zeigten bei den täglichen Visiten keine Auffälligkeiten. Zwei Mäuse entwickelten multiple Adhäsionen, zwei Mäuse fibröse Adhäsionen.

In der Versuchsgruppe, die mit Phospholipid gespült wurde, verstarb eines der fünf behandelten Mäuse im Rahmen der Narkose. Ein weiteres Tier verstarb am siebten

postoperativen Tag an einem Platzbauch. Die im folgenden durchgeführte Sektion zeigte keine weitere Ursache für den Tod. Die tägliche Visite zeigte keine Auffälligkeit bei den übrigen Tieren. Je eine Maus entwickelte multiple Adhäsionen und oberflächliche Adhäsionen und ein Tier blieb ohne Adhäsionen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Abb. 22 und 23 im Anhang zeigen für jedes Tier exemplarisch je ein Photo und die Ausdehnung der Adhäsion.

Tab. 11: Adhäsionsinhibition Phospholipidspülung

	Kochsalz Lösung (n=5)	Phospholipid (n=4)
0 = Keine Adhäsion		2
1 = Oberflächliche Adhäsionen		1
2 = Fibröse Adhäsionen	2	
3 = Multiple Adhäsionen	3	1

Gruppen: Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), Phospholipid 0,75%

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Adhäsionsinhibition in vivo

Bei den behandelten Tieren konnte in der Kontrollgruppe, die mit Kochsalzlösung gespült wurde, in 88,2 % (15/17) der Fälle Adhäsionen verzeichnet werden. Ein Tier verstarb am sechsten postoperativen Tag; im Rahmen der Sektion wurde ursächlich ein Bridenileus gesehen. Ein weiteres Tier aus der Kontrollgruppe verstarb am siebten postoperativen Tag unklarer Ursache. Im Rahmen der Sektion konnten Adhäsionen nicht sicher nachgewiesen werden. Dieses Tier und ein weiteres Tier entwickelten keine Adhäsionen. Im Rahmen der täglichen Visite wurde bis auf die zwei Todesfälle keine Auffälligkeit beobachtet. Der Grad der Adhäsionen betrug im Mittel 2, entsprechend einem fibrösen Adhäsionsscore.

Bei den Mäusen, die mit Phospholipid gespült wurden (n=7), konnte die Ausdehnung der Adhäsionen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert werden (p=0,04). Im Mittel wurden Adhäsionen von 1 Scorepunkt erzielt, entsprechend oberflächlichen Adhäsionen. Insgesamt wurden bei 71 % der Tiere (5/7) Adhäsionen verzeichnet. Ein Tier verstarb am siebten postoperativen Tag an einem Platzbauch. Adhäsionen wurden bei diesem Tier nicht beobachtet. Die tägliche Visite bei den Mäusen zeigte keine weiteren Auffälligkeiten.

Bei den Mäusen, die mit spezifischen Oligopeptiden gespült wurden, verstarb ein Tier am vierten postoperativen Tag. Todesursache war ein Platzbauch. Die tägliche Visite zeigte keine weitere Auffälligkeit bei den übrigen Tieren. Insgesamt entwickelten die Mäuse im Mittel Adhäsionen mit einem Score von 1,6, entsprechend der Ausbildung von fibrösen Adhäsionen. Die Ausdehnung der Adhäsionen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant reduziert werden ($p=0,475$). Von Adhäsionen waren 62,5 % (5/8) der Tiere betroffen.

Bei peritonealer Spülung mit spezifischen modifizierten Oligopeptiden wurden keine Auffälligkeiten im Rahmen der täglichen Visite gesehen. Bei den Mäusen konnte die Ausbildung von Adhäsionen auf 50 % (3/6) der Tiere reduziert werden. Die Ausdehnung der Adhäsionen wurde ebenfalls signifikant reduziert ($p=0,001$) und ergab auf der Skala 0,5 Scorepunkte, entsprechend einer Ausdehnung zwischen keinen und oberflächlichen Adhäsionen.

Insgesamt wurden 45 Tiere behandelt. Im Rahmen der Narkose verstarben insgesamt sieben Tiere, die von statistischen Auswertungen ausgeschlossen wurden. Die statistische Auswertung erfolgte daher mit 38 Tieren.

Die zusammenfassende Auswertung schloss alle drei Versuchsansätze ein. Die entsprechenden Gesamtergebnisse und Schweregrade der Adhäsion im Gruppenvergleich sind in Tabelle 12 und Abbildung 14 dargestellt.

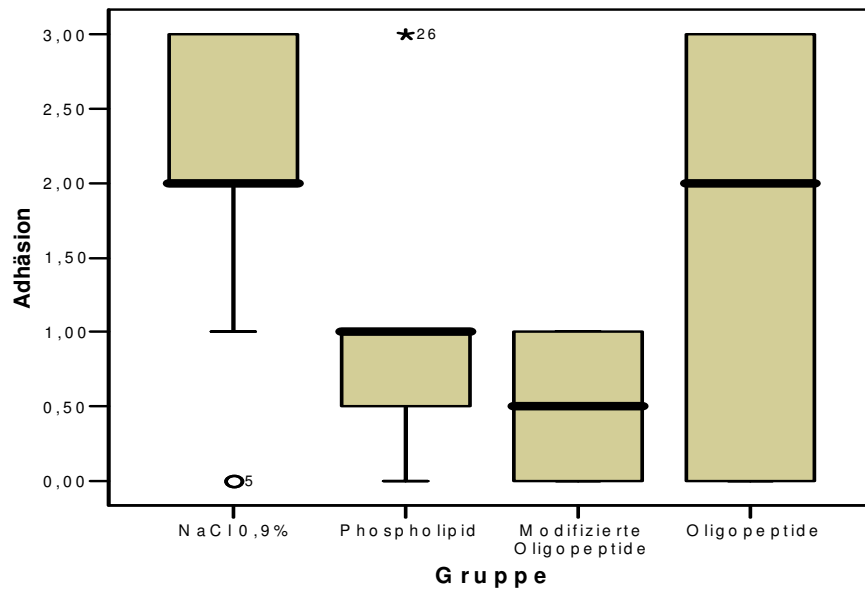
Tab. 12: Adhäsionsscore in Relation zur Spüllösung

	Kochsalz Lösung (n=17)	Phospholipid (n=7)	Kombinierte modifizierte Oligopeptide (n=6)	Kombinierte Oligopeptide (n=8)
0 = Keine Adhäsion	2	2	3	3
1 = Oberfl. Adhäsionen	2	4	3	
2 = Fibröse Adhäsionen	5			2
3 = Multiple Adhäsionen	8	1		3

Gruppen: Kontrolle Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), Phospholipid 0,75%, modifizierte Oligopeptide kombiniert (GRGDS, EILDV, KQAGDV je 3mg/ml NaCl 0,9%) und Oligopeptide kombiniert (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV je 3mg/ml NaCl 0,9%).

Die explorative Datenanalyse ergab folgende als Boxplot (Abb. 14) dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung des Adhäsionsschweregrades.

Abb. 14: Gruppenvergleich des Adhäsionsschweregrades



Der fettgedruckte Balken der Box zeigt den Gruppenmedian. Innerhalb der Box befinden sich 50 % der Werte, außerhalb liegen die Werte der unteren bzw. oberen Quartile. Die Markierung außerhalb der Box zeigen die Ausreißer (5%) der Gruppen, 5 stellt die Maus ohne Adhäsionen der Kontrollgruppe, 26 die Maus mit multiplen Adhäsionen aus der Phospholipidgruppe dar.

IV Diskussion

4.1 Literaturübersicht

4.1.1 Postoperative peritoneale Adhäsionen

Adhäsionen nach intraoperativen Läsionen sind die häufigste Ursache für Ileus, sekundäre Infertilität und häufig auch für abdominale Schmerzen. Des weiteren können sie auch zu versehentlichen Darmverletzungen bei abdominalen Re-Eingriffen führen. Aufgrund ihrer hohen Prävalenz und der weitreichenden, möglicherweise noch nach Jahrzehnten auftretenden Folgen bzw. Komplikationen stellen sie eine erhebliche Belastung für Patienten, Chirurgen und das Gesundheitswesen dar. Das einzig mögliche Therapieverfahren bei bekanntem „Adhäsionsbauch“ ist eine operative Lösung der Verwachsungen (Adhäsiolektomie). Allerdings werden die adhäsionsbedingten Beschwerden dadurch nur selten vollständig beseitigt, da die Wahrscheinlichkeit für eine erneute Adhäsionsbildung und damit wiederkehrende Symptome groß ist. Dieser Aspekt unterstreicht den Bedarf an einem einfachen Verfahren zur Prävention von Adhäsionen im Anschluss an Operationen.

Das Peritoneum stellt eine hochspezialisierte bioaktive zelluläre Membran dar, welche die Bauchhöhle und einen Großteil der Viszeralorgane auskleidet und bei Krankheitsprozessen, wie Peritonitis, intraoperativ gesetzten Läsionen oder Peritonealkarzinose, eine bedeutende Rolle spielt. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse und intraoperativer Läsionen der Bauchhöhle kommt es zu einer oft erheblichen Störung der Integrität des Peritoneums. Nach Peritonealläsion setzen Mastzellen Histamin frei; es kommt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Es folgt die Exsudation von inflammatorischen Zellen, darunter insbesondere Fibroblasten, neutrophile Granulozyten, Plasmazellen und Makrophagen und die Ausbildung von Fibringerinnseln. Das Fibringerinnsel wird durch verminderte Fibrinolyse nach und nach in vaskuläres Granulationsgewebe umgewandelt. Fibroblasten, Makrophagen und Riesenzellen produzieren Mediatoren, welche die entzündliche Reaktion beeinflussen. Das Fibringerinnsel wird von proliferierenden Fibroblasten infiltriert, die Kollagen und andere Bindegewebsproteine ablagern. Die auf diese Weise gebildete Matrix entwickelt sich zu einer fibrösen Masse, in der sich vornehmlich Fibroblasten befinden. Es resultieren Bindegewebszüge, peritoneale Adhäsionen unterschiedlichsten Ausmaßes, die zu individuell verschiedenen Symptomen führen können.

Die Therapie der postoperativen peritonealen Adhäsion wird seit Jahrzehnten von verschiedenen Arbeitsgruppen beforscht. Zur Auslösung von postoperativen Adhäsionen wurden unterschiedliche Tiermodelle etabliert. Je nach Methodik und den

zur Testung anstehenden Substanzen wurden die Experimente mit großen Labortieren (z.B. Hund oder Schwein) sowie mit kleinen Labortieren (z.B. Mäusen, Ratten oder Kaninchen) durchgeführt.

So wurden die Noble'sche Darmplikaturen in einem Hunde-Tiermodell angewandt. Hierbei wurde versucht, durch meanderförmige Fixierung der Dünndarmschlingen eine Prophylaxe des Adhäsionsileus zu erzielen (Noble, 1937). In der jüngeren Literatur werden vor allem einmalige Gaben von Testsubstanzen kurz vor peritonealem Verschluss untersucht. Um eine gute Effizienz bei geringer Dosis der Testsubstanz zu erzielen, wurden im allgemeinen Tiermodelle im Kaninchen, der Ratte und in der Maus bevorzugt. Saltzman et al. etablierten ein Tiermodell zur Untersuchung von postoperativen Adhäsionen in der Maus. Balb/c Mäusen wurde zur Induktion von postoperativen Adhäsionen während einer standardisierten Operation in Narkose eine definierte peritoneale Läsion gesetzt. Die zu untersuchenden Testsubstanzen wurden kurz vor dem peritonealem Verschluss intraperitoneal appliziert. Nach 14 Tagen wurden die Mäuse geopfert und das Ausmaß der Adhäsion dokumentiert. Die peritoneale Läsion bestand aus einer Serosaläsion des Darmes sowie einer Koagulationsnekrose am parietalen Peritoneum der Bauchwand. Nach standardisiertem Vorgehen wurde jeder Maus zunächst durch Abschilferung der Serosa des Zökums eine Serosaläsion und danach eine umschriebene Koagulationsnekrose an der Bauchwand gesetzt. Auf diese Weise ließen sich in 92 % der Tiere multiple Adhäsionen auslösen (Saltzman et al., 1996).

Treutner et al. testeten unter anderem die Fähigkeit von Phospholipid in verschiedenen Dosierungen postoperative peritoneale Adhäsionen zu inhibieren. Untersucht wurden insgesamt acht unterschiedliche Substanzen zur Verminderung von postoperativen Adhäsionen. Behandelt wurden je Gruppe 20 Kaninchen, denen durch Abrasion der Serosa des Ileums, der Appendix und der Bauchwand eine intraoperative Läsion zugefügt wurde. Nach einmaliger intraperitonealer Gabe der Testsubstanz wurde das Abdomen verschlossen. Die Opferung der Tiere erfolgte nach 10 Tagen. In einer Kontrollgruppe fand keine Administration von Testsubstanzen statt. Im Vergleich konnten die Phospholipide die Ausbildung von Adhäsionen auf 14% reduzieren (Treutner et al., 1995). Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Ar'Rajab und Snoj bestätigt (Ar'Rajab et al., 1991; Snoj et al., 1992). Weitere Studien konnten unerwünschte Nebenwirkungen der Phospholipide auf die Wundheilung von Darmanastomosen, der Haut und von Leberläsionen ausschließen (Müller et al., 2001a; Müller et al., 2001b). Die Versuche wurden in einem

zuvor etablierten Kaninchenmodell durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass die Phospholipide in unterschiedlichen Dosierungen eine ausgezeichnete Fähigkeit besitzen, die Entstehung von peritonealen Adhäsionen postoperativ zu vermindern. Unterschiedliche Dosierungen (0,75%, 0,075% und 0,0075%) des Phospholipids konnten allesamt keine signifikant besseren Ergebnisse erzielen. Die Phospholipide zeigten keine Nebenwirkungen in Bezug auf die Wundheilung (Müller et al., 2001a; Müller et al., 2001b).

4.1.2 Einsatz spezifischer integrinblockierender Oligopeptide

In den frühen 80er Jahren wurde die Bedeutung der Extrazellulärmatrix im Allgemeinen und des Extrazellulärmatrix-Proteins Fibronectin im Speziellen bei der Zelladhäsion und der Interaktion von Zellen mit der umgebenen Matrix erkannt. Es konnte gezeigt werden, dass Integrine die zelluläre Adhärenz durch Erkennung und Bindung an spezifische Peptidsequenzen an Extrazellulärmatrix-Proteine vermitteln (Ruoslahti und Engvall, 1980). Die Integrine besitzen spezifische Sequenzen von Aminosäuren, Oligopeptiden, die als Bindungsstellen für die Adhäsion zuständig sind. Durch Einsatz dieser Aminosäuresequenzen kann die Adhäsion kompetitiv inhibiert werden. Für Fibronectin wurde das Tripeptid RGD als die minimal erforderliche Sequenz für eine Ligand-Rezeptor-Interaktion charakterisiert (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987; Hynes, 1992). Der Einsatz spezifischer integrinblockierender Oligopeptide kann in unterschiedlichen Organsystemen bei verschiedensten Erkrankungen erfolgen. Integrinrezeptoren treten nahezu ubiquitär auf und stellen wichtige Schaltstellen bei der Vermittlung von Zelladhäsionen dar.

So zeigten Whalen und Ingber bereits 1989, dass spezifische synthetische Oligopeptide mit Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) Sequenz Tumorzelladhäsionen an die Extrazellulärmatrix hemmen können. Unter anderem konnte beobachtet werden, dass das spezifische Oligopeptid Glycin-Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin (GRGDS) in einem Zelladhäsionsassay die Adhäsion verschiedener Tumorzelllinien an Fibronectin inhibiert. In einem Tiermodell der Maus konnte durch Einsatz von GRGDS die Adhäsion von verschiedenen Tumorzelllinien an eine chirurgische Wunde, im Sinne einer Portmetastase, inhibiert werden (Whalen und Ingber, 1989). Die Möglichkeit, Tumorzellinvasion durch spezifische Oligopeptide zu inhibieren, konnte im Rahmen von in vitro Untersuchungen durch Brenner et al. bestätigt werden. In einer Chemotaxis-Kammer ließen sich mittels RGD die Invasion und Migration von Nierenzellkarzinomzellen inhibieren (Brenner et al., 2000).

Dass Integrinrezeptoren eine wichtige Rolle im Rahmen der Angiogenese spielen, wurde von Brooks et al. nicht nur bestätigt, die Arbeitsgruppe konnte auch durch spezifische Blockierung der Integrinrezeptoren eine Apoptose von blutgefäßbildenden Zellen erzielen. Nach Induktion der Angiogenese durch Gabe von Zytokinen ließen sich zunächst eine vermehrte Vaskularisierung und eine gesteigerte Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$ verzeichnen. Durch Einsatz eines zyklisch modifizierten RGD Peptids konnte die Vaskularisierung suffizient gestoppt werden (Brooks et al., 1994b).

Hyacinthe et al. konnten bereits 1995 nachweisen, dass eine Implantation von Urothelkarzinomzellen an eine Extrazellulärmatrix in vitro und an ein durch Koagulation verletztes Urothel der Blase in vivo durch spezifische Oligopeptide (GRGDS) inhibiert werden kann (Hyacinthe et al., 1995). Böhle et al. bestätigten diese Befunde und weiteten die Untersuchungen auf weitere Oligopeptide, insbesondere auf den Einsatz von Oligopeptidkombinationen, aus. Eingesetzt wurden neben GRGDS auch EILDV und KQAGDV sowie Kombinationen dieser Oligopeptide (Böhle et al., 2002).

Im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen vermitteln Integrinrezeptoren Extravasation, Migration und Adhäsionen von Leukozyten. Die Arbeitsgruppe um Jackson konnte durch spezifische Antikörper und auch durch spezifische Oligopeptide gegen Integrinrezeptoren die Adhäsion und Migration von Leukozyten in vitro inhibieren (Jackson et al., 1997).

Der Einsatz spezifischer Oligopeptide bei entzündlichen Erkrankungen führte unter anderem zu einer Verminderung von unerwünschten Adhäsionen und damit verbundenen Symptomen. Dieses gelang insbesondere der Arbeitsgruppe um Storgard bei der rheumatoiden Arthritis. Durch integrinspezifische Oligopeptide sowie durch integrinspezifische Antikörper konnte in einem Tiermodell des Kaninchens die Leukozytenmigration und synoviale Neoangiogenese bei der rheumatoiden Arthritis inhibiert werden. Zum Einsatz kamen zyklisch modifizierte Oligopeptide mit einer RGD Sequenz (Storgard et al., 1999).

Die Migration glatter Muskelzellen aus der Tunica media in die Tunica intima stellt einen wesentlichen Pathomechanismus bei der Arteriosklerose und der Re-Stenose nach Angioplastie dar. Hier ließ sich ebenfalls durch Einsatz von integrinspezifischen Antikörpern sowie durch das integrinspezifische Oligopeptide RGD die Invasion von glatten Muskelzellen in vitro inhibieren (Kanda et al., 2000).

Diese aktuelle Liste belegt den klinischen Einsatz spezifischer integrinblockierender Oligopeptide in verschiedenen Organsystemen zur Verminderung von Adhäsionen.

4.2 Adhäsionsinhibition in vitro

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass integrinspezifische Oligopeptide die Adhäsion zwischen Fibroblasten und Molekülen der Extrazellulärmatrix effektiv inhibieren.

Im durchgeführten Zelladhäsionsassay wurden Mausfibroblasten eingesetzt, da auch die Untersuchungen zur Inhibition von postoperativen peritonealen Adhäsionen im Mausmodell erfolgten. Unterschiede bezüglich der Adhäsionsoberflächenmoleküle zwischen Mausfibroblasten und humanen Fibroblasten sind nicht bekannt (Whalen und Ingber, 1989; Brenner et al., 2000).

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten im Zelladhäsionsassay erfolgte mit Fibronectin allein sowie in Kombination mit Laminin und Kollagen. Diese drei Moleküle gehören zu den Hauptbestandteilen der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran. Durch eigene Voruntersuchungen und im Rahmen einer Literaturrecherche konnten die Bindungssequenzen von Fibronectin, Laminin und Kollagen an Integrinrezeptoren identifiziert werden. So sind kurze spezifische Aminosäuresequenzen für die Adhäsion zwischen den Komponenten der Extrazellulärmatrix und Fibroblasten zuständig (Hynes, 1992). Es handelt sich dabei um die bekannten und eingesetzten Oligopeptidsequenzen GRGDS, EILDV und KQAGDV (Böhle et al., 2002). Neben den aus der Literatur bekannten spezifischen Oligopeptiden wurden darüber hinaus modifizierte Oligopeptide eingesetzt. Durch die Modifikation werden ursprünglich lineare Oligopeptide zyklisch geformt. Die Modifikationen sollten zudem einen vorzeitigen proteolytischen Abbau bei intraperitonealem Einsatz in vivo verhindern.

In den in vitro Untersuchungen wurde zunächst die Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin untersucht. Hynes konnte zeigen, dass Fibronectin mehr als einen Liganden besitzt. Neben der bekannten Oligopeptidsequenz RGD wurden auch EILDV und KQAGDV als Liganden von Fibronectin beschrieben (Hynes, 1992). Hier konnte gezeigt werden, dass die spezifischen Oligopeptide GRGDS und EILDV sowie modifiziertes EILDV im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten die Adhäsion an den Monolayer vollständig inhibieren konnten. Bei Einsatz von KQAGDV, des modifizierten GRGDS und des modifizierten KQAGDV wurde die Adhäsion der Fibroblasten an Fibronectin im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten signifikant reduziert. Im Vergleich untereinander konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Oligopeptiden beobachtet werden. Daraus lässt sich unter anderem bestätigen, dass Fibronectin nicht nur über eine spezifische Bindungsstelle verfügt.

In den weiteren Versuchen wurde die Adhäsion von Fibroblasten an eine Mischmatrix aus Fibronectin, Laminin und Kollagen untersucht. Dabei konnten die eingesetzten spezifischen Oligopeptide EILDV und das modifizierte EILDV im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten die Adhäsion nahezu vollständig inhibieren. Bei Einsatz der spezifischen Oligopeptide GRGDS und KQAGDV und des modifizierten KQAGDV wurde die Adhäsion der Fibroblasten an die Mischmatrix im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten signifikant reduziert. Das modifizierte GRGDS zeigte im Zelladhäsionsassay keine Fähigkeit zur Inhibition der Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix.

Diese Befunde bestätigen frühere Untersuchungen von Böhle et al., die ebenfalls für die spezifischen Oligopeptide GRGDS und EILDV eine sehr gute Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition in vitro zeigen konnten. Die Untersuchungen von Böhle et al. wurden jedoch an Urothelkarzinomzellen und nicht an Fibroblasten vorgenommen. Die hier durchgeführten Adhäsionsassays und die Untersuchungen von Böhle et al. erzielten bei beiden Zellpopulationen gleichermaßen eine deutliche Inhibition von Zelladhäsionen (Böhle et al., 2002). Insgesamt scheint die Potenz der Adhäsionsinhibition an Mischmatrix vermindert im Vergleich zu den Untersuchungen an dem Monolayer mit Fibronectin.

In zusätzlichen Untersuchungen wurde die Potenz von Phospholipid im Vergleich zu GRGDS zur Inhibition der Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix untersucht. Hier wurde einerseits, wie in den Vorversuchen, eine signifikante Minderung der Zelladhäsion durch GRGDS im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten gesehen. Andererseits konnte der Einsatz von Phospholipid eine konzentrationsabhängige Minderung der Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix erzielen.

Eine Kombination der spezifischen Oligopeptide (GRGDS, EILDV, KQAGDV) führte zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Adhäsion zwischen Fibroblasten und Mischmatrix. Ebenfalls konnten die eingesetzten modifizierten Oligopeptide (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV) signifikant und konzentrationsabhängig die Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix inhibieren. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass mehrere Matrixmoleküle für die zelluläre Adhäsion verantwortlich sind und demnach für eine effektive Inhibition der Zelladhäsion eine Kombination unterschiedlicher rezeptorblockierender Oligopeptide nötig ist.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Potenz zur Adhäsionsinhibition zwischen den modifizierten und nicht modifizierten Oligopeptiden gezeigt werden. Obwohl die Tendenz zur Adhäsionsinhibition in vitro durch Oligopeptide durch die modifizierten

Oligopeptide leicht vermindert erscheint, konnte dieses statistisch nicht belegt werden. Der in vivo Einsatz der modifizierten Oligopeptide ist aufgrund der angenommenen längeren biologischen Verfügbarkeit und der gleichen Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition vielversprechend.

4.3 Adhäsionsinhibition in vivo

Die Fähigkeit von spezifischen Oligopeptiden und spezifischen modifizierten Oligopeptiden in einem von Saltzman et al. etablierten Tiermodell postoperative Adhäsionen im Vergleich mit Phospholipid und Kochsalzlösung zu inhibieren wurde getestet. Die Auswahl des Tierversuchsaufbaus wurde stark geprägt durch das Ziel, die Menge an applizierten spezifischen Oligopeptiden möglichst gering zu halten. Der Vorteil eines Mausmodells zur Untersuchung von postoperativen peritonealen Adhäsionen liegt in der relativ kleinen Peritonealhöhle im Vergleich zu anderen Versuchstieren und somit einem entsprechend geringeren Bedarf an Testsubstanz.

Im Rahmen der Narkose mit Pentobarbital verstarben 7 Tiere. Diese hohe Anzahl kann nicht erklärt werden. Im Rahmen langjähriger Erfahrungen mit Versuchstieren war eine so hohe Morbidität durch die Narkose nie beobachtet worden. Die genaue Applikation des Narkotikums erfolgte durch gewichtsadaptierte Gabe. Als Erklärung scheint am ehesten eine Verunreinigung des Narkotikums ursächlich; eine erhöhte Konzentration des Narkotikums kann durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen werden.

Die mit Kochsalzlösung behandelten Tiere (n=17) bildeten in 88 % (15/17) der Mäuse postoperative Adhäsionen. Dieses Ergebnis entspricht dem von Saltzman et al. publizierten Versuchsansatz; dort entwickelten in der Kontrollgruppe 92 % der Mäuse eine postoperative Adhäsion (Saltzman et al., 1996). Beide Versuchsansätze erreichten entsprechend eine sehr gute Adhäsionsausbildung. Der Versuchsansatz eignet sich entsprechend zur Testung von Adhäsionsprophylaktika. Die Tiere mit Adhäsionen (n=15) entwickelten zu 53 % multiple Adhäsionen (n=9); eines dieser Tiere verstarb an einem Bridenileus.

Als Positivkontrolle erfolgte die Spülung der Peritonealhöhle mit Phospholipid. Phospholipid kann, wie von Treutner et al. publiziert, postoperative peritoneale Adhäsionen minimieren (Treutner et al., 1995). In den hier gezeigten Versuchen konnte durch peritoneale Spülung mit Phospholipid im Vergleich mit Kochsalzlösung eine signifikante Inhibition der Adhäsionsausdehnung erzielt werden ($p=0,04$). Obwohl 71 % der Tiere postoperativ Adhäsionen entwickelten, wurde der Schweregrad der

Adhäsionen vermindert. Ein Tier verstarb an einem Platzbauch, keine weiteren Auffälligkeiten wurden beobachtet. Die Ursache des Platzbauches kann nicht sicher geklärt werden. Müller et al. schlossen in ihren Studien Störungen der Wundheilung durch Phospholipide aus (Müller et al., 2001a; Müller et al., 2001b). Trotzdem kann eine Nebenwirkung, induziert durch die Spülung mit Phospholipid, nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die postoperative Spülung der Peritonealhöhle mit einer Kombination spezifischer Oligopeptide führte im Vergleich zur Spülung mit Kochsalzlösung zu keiner signifikanten Verminderung der peritonealen Adhäsionsausdehnung ($p=0,475$). Insgesamt entwickelten 63 % der Mäuse Adhäsionen. Ein Tier verstarb an einem Platzbauch. Bei diesem Tier konnte eine durch die Spülung mit Oligopeptiden induzierte Nebenwirkung nicht ausgeschlossen werden.

Der Einsatz einer Kombination von modifizierten Oligopeptiden konnte im Vergleich mit der Kochsalzlösung signifikant die Adhäsionen inhibieren ($p=0,001$). Nur 50 % der Tiere entwickelten Adhäsionen. Nebenwirkungen durch die modifizierten Oligopeptide wurden nicht beobachtet. Die Modifikationen der Oligopeptide sollten zu einer besseren biologischen Verfügbarkeit und zur Reduktion einer frühzeitigen Proteolyse der Oligopeptide führen. Ob die klassischen Oligopeptide im Peritoneum frühzeitig proteolytisch abgebaut werden, bleibt zu beweisen. Die modifizierten Oligopeptide konnten ihre Fähigkeit zur Verminderung postoperativer peritonealer Adhäsionen belegen. Insgesamt wurden die peritonealen Spülungen mit klassischen Oligopeptiden und modifizierten Oligopeptiden von den Mäusen gut vertragen; es gibt keinen Anhalt für Unverträglichkeiten, Wundheilungsstörungen oder andere Nebenwirkungen. Die klassischen Oligopeptide konnten keine Fähigkeit zur Verminderung postoperativer peritonealer Adhäsionen demonstrieren.

Im Rahmen meiner Untersuchungen verstarben zwei Tiere an einem Platzbauch, je ein Tier aus den Gruppen Phospholipidspülung und Oligopeptidspülung. Vorzeitig verstarb ein weiteres Tier aus der Gruppe mit Kochsalzspülung unklarer Genese. Aufgrund der kleinen Versuchsgruppen kann jedoch trotzdem nicht auf Nebenwirkungen durch Phospholipide oder Oligopeptide geschlossen werden. Jedoch können ursächlich auch nicht sicher Wundheilungsstörungen durch Oligopeptide oder Phospholipide ausgeschlossen werden. Müller et al schlossen in ihren Untersuchungen Wundheilungsstörungen durch Phospholipide aus (Müller, 2001b). Genauere Aufschlüsse über Nebenwirkungen könnte nur ein umfänglicheres Untersuchungskollektiv geben.

4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen die Wirksamkeit von spezifischen modifizierten Oligopeptiden zur Inhibition von Adhäsionen zwischen Molekülen der Extrazellulärmatrix und Zellen, wie den Fibroblasten.

Im durchgeführten Zelladhäsionsassay konnten nicht nur die spezifischen Oligopeptide die Adhäsion zwischen Molekülen der Extrazellulärmatrix und Fibroblasten inhibieren; auch eingesetztes Phospholipid konnte die Adhäsion von Fibroblasten an Extrazellulärmatrix signifikant und konzentrationsabhängig inhibieren. Bei Einsatz kombinierter spezifischer Oligopeptide und kombinierter modifizierter Oligopeptide konnte die Adhäsion signifikant und konzentrationsabhängig vermindert werden. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass für eine effektive Inhibition der zellulären Adhäsion der Einsatz einer Kombination unterschiedlicher rezeptorblockierender Oligopeptide nötig ist. Des weiteren wurde durch Modifikation der Oligopeptide die Fähigkeit zur Adhäsionsinhibition zwischen Fibroblasten und Extrazellulärmatrix nicht vermindert.

Eine Verminderung der Ausdehnung postoperativer peritonealer Adhäsion konnte signifikant durch modifizierte Oligopeptide und durch Phospholipid erzielt werden. Insbesondere die zur Vermeidung von postoperativen peritonealen Adhäsionen durchgeführte einmalige Spülung des Peritoneums mit spezifischen modifizierten Oligopeptiden lässt gute klinische Erfolge erwarten. Nebenwirkungen wurden in diesem kleinen Versuchsansatz nicht beobachtet.

Die Adhäsionsausbildung in der Kontrollgruppe betrug 88 %, Saltzman et al. konnte in der Kontrollgruppe in 92 % der Tiere Adhäsionen erzielen (Saltzman et al., 1996).

Im Rahmen der durchgeführten Versuche verstarben insgesamt vier Tiere vorzeitig. Ein Tier aus der Kontrollgruppe verstarb an einem Bridenileus. Der Versuchsaufbau sollte zu Adhäsionen führen, entsprechend war ein Bridenileus eine erwartete Komplikation. Zwei Tiere verstarben an einem Platzbauch. Bei einem Tier mit Platzbauch wurde das Peritoneum mit Phospholipid gespült, bei dem anderen Tier mit spezifischen Oligopeptiden. Die Ursache des Platzbauches bleibt unklar. Die Mäuse wurden im postoperativen Verlauf in ihrer Bewegungsfreiheit nicht eingeschränkt und hätten daher die Nähte lösen können, eine Wundheilungsstörung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ein weiteres Tier verstarb mit unklarer Genese am siebten postoperativen Tag, dieses Tier war mit Kochsalzlösung gespült worden.

Bisher sind keine Nebenwirkungen durch klassische oder modifizierte Oligopeptide bekannt. Trotzdem bleibt eine genauere Überprüfung von Nebenwirkungen wie Wundheilungsstörungen durch Oligopeptide durchzuführen.

Die modifizierten Oligopeptide konnten im Vergleich zu den klassischen Oligopeptiden signifikant die Ausbildung und Ausdehnung von peritonealen Adhäsionen vermindern. Ursächlich sind die vollzogenen Modifikationen. Ob die Modifikationen zu einer verbesserten biologischen Verfügbarkeit führen durch verzögerten Abbau durch Proteasen oder durch die zyklischen Eigenschaften bleibt offen.

Der Einsatz von modifizierten Oligopeptiden zur Prophylaxe von peritonealen Adhäsionen erscheint vielversprechend und sollte bald Einzug in den klinischen Alltag finden.

Ein vorstellbarer Nachteil sind die hohen Herstellungskosten der synthetisch modifizierten Oligopeptide. Eine breite Anwendungsmöglichkeit modifizierter Oligopeptide könnte die Herstellungskosten reduzieren.

V Zusammenfassung

Integrine sind Oberflächenmoleküle von Zellen. Sie vermitteln Adhäsionen untereinander sowie an die Extrazellulärmatrix. Die Adhäsion wird über kurze spezifische Oligopeptidsequenzen herbeigeführt. Die spezifischen Oligopeptidsequenzen zur Bindung an Moleküle der Extrazellulärmatrix sind bekannt. So binden Integrine über die RGD Sequenz an Fibronectin, über die LDV Sequenz an Fibronectin und Laminin und über die KQAGDV Sequenz an Kollagene und Fibrinogen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass spezifische Oligopeptide in löslicher Form die Adhäsion von Fibroblasten an Moleküle der Extrazellulärmatrix inhibieren können. Eingesetzt wurden die spezifischen Oligopeptide GRGDS, EILDV und KQAGDV und deren modifizierte Formen. Die Modifikation erfolgte zur Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit.

In einem Zelladhäsionsassay wurde die Fähigkeit spezifischer Oligopeptide zur Inhibition der Adhäsion von Fibroblasten an Moleküle der Extrazellulärmatrix getestet. Mikrotiterplatten wurden mit Molekülen der Extrazellulärmatrix beschichtet und mit Fibroblasten und spezifischen Oligopeptide inkubiert. Der Anteil der adhärenenten Zellen wurde im MTT Test photometrisch bestimmt.

Im Zelladhäsionsassay konnten die einzeln eingesetzten spezifischen Oligopeptide GRGDS, EILDV, KQAGDV, modifiziertes GRGDS, modifiziertes EILDV und modifiziertes KQAGDV signifikant im Vergleich zu unbehandelten Fibroblasten die Adhäsion von Fibroblasten an Fibronectin inhibieren. Durch jeweiligen Einsatz der Oligopeptide GRGDS, EILDV, KQAGDV, modifiziertes EILDV und modifiziertes KQAGDV ließ sich auch die Adhäsion von Fibroblasten an eine Mischmatrix inhibieren. Bei Einsatz kombinierter klassischer und modifizierter Oligopeptide konnte jeweils die Adhäsion an Mischmatrix signifikant und konzentrationsabhängig inhibiert werden.

Phospholipid, in klinischer Erprobung zur Prophylaxe von peritonealen Adhäsionen, konnte im Zelladhäsionsassay signifikant und konzentrationsabhängig die Adhäsion von Fibroblasten an Mischmatrix inhibieren.

Im Rahmen eines in vivo Versuches wurden Oligopeptide zur Prophylaxe von postoperativen peritonealen Adhäsionen eingesetzt. 45 Mäusen wurden hierzu definierte peritoneale Läsionen gesetzt. Vor dem peritonealen Verschluss wurde die Bauchhöhle mit spezifischen Oligopeptiden, modifizierten Oligopeptiden, Phospholipiden als Positivkontrolle und Kochsalzlösung als Negativkontrolle gespült. Nach 14 Tagen erfolgte die Opferung der Tiere und die Quantifizierung der Ausdehnung der induzierten Adhäsionen.

Postoperative Adhäsionen traten in der Kontrollgruppe in 88 % aller Tiere auf. Zur Prophylaxe von peritonealen Adhäsionen eingesetzte klassische Oligopeptide konnten keine signifikante Verminderung der Ausdehnung oder des Auftretens von peritonealen Adhäsionen erzielen. Spülung der Bauchhöhle mit Phospholipid führte zu einer signifikanten Verminderung der Ausdehnung peritonealer Adhäsionen. Bei Einsatz von modifizierten Oligopeptiden konnte das Ausmaß sowie das Auftreten von peritonealen Adhäsionen ebenfalls signifikant vermindert werden.

Im Rahmen des Versuches verstarben vier Tiere vorzeitig. Zwei Tiere, je ein Tier aus der Gruppe mit Phospholipidspülung und Oligopeptidspülung, verstarben an einem Platzbauch. Die Ursache des Platzbauches bleibt unklar, Wundheilungsstörungen können nicht sicher ausgeschlossen werden. Ein Tier aus der Kontrollgruppe verstarb mit unklarer Genese und ein Tier aus der Kontrollgruppe verstarb an einem Bridenileus.

Der Einsatz von modifizierten Oligopeptiden zur Prophylaxe von postoperativen peritonealen Adhäsionen durch einmalige Spülung der Bauchhöhle lässt gute klinische Erfolge erwarten.

VI Literaturverzeichnis

1. Aina, O.H., Sroka, T.C., Chen, M.L., Lam, K.S.: Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* **66** (2002): 184-189
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: Molecular Biology of the Cell, Garland Science (2002).
3. Argraves, W.S., Suzuki, S., Arai, H., Thompson, K., Pierschbacher, M.D., Rouslahti, E.: Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol* **105**(1987): 1183-1190
4. Ar´Rajab, A., Ahren, B., Rozga, J., Bengmark, S.: Phosphatidylcholine prevents postoperative peritoneal adhesions: An experimental study in the rat. *J Surg Res* **50**(1991) : 212
5. Baker, J.W.: A long jejunostomy tube for decompressing intestinal obstruction. *Surg Gynecol Obstet* **109** (1959): 518-520
6. Barbadillo, C., G-Arroyo, A., Salas, C., Mulero, J., Sanchez-Madrid, F., Andreu, J.L.: Anti-integrin immunotherapy in RA: protective effect of anti $\alpha 4$ antibody in adjuvant arthritis. *Springer Semin. Immunopathol* **16** (1995): 375 – 379
7. Blystone, S.D., Graham, I.L., Lindberg, F.P., Brown, E.J.: Integrin $\alpha_v\beta_3$ differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor $\alpha_5\beta_1$. *J Cell Biol* **127** (4) (Nov 1994): 1129 – 1137
8. Böhle, A., Jurczok, A., Ardelt, P., Wulf, T., Ulmer, A.J., Jocham, D., Brandau, S.: Inhibition of Bladder Carcinoma Cell Adhesion by Oligopeptide Combinations in vitro and in vivo. *J Urol* **167** (2002): 357 – 363
9. Bosman, F.T.: Integrins : Cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* **25** (1993): 469 - 477

10. Brenner, W., Gross, S., Steinbach, F., Horn, S., Hohenfellner, R., Thüroff, J.W.: Differential inhibition of renal cancer cell invasion mediated by fibronectin, collagen IV and Laminin. *Cancer Lett* **155** (2) (Jul 2000): 199-205

11. Brooks, P.C., Clark, R.A.F., Cheresh, D.A. : Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* **264** (1994a): 569 - 571

12. Brooks, P.C., Montgomery, A.M.P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., Cheresh, D.A.: Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels. *Cell* **79** (1994b): 1157- 1164

13. Brown, P.J. and Juliano, R.L.: Selective inhibition of fibronectin-mediated adhesion by monoclonal antibodies to a cell surface glycoprotein. *Science* **228** (1985): 1448 - 1451

14. Bryant, T.: Clinical lectures on intestinal obstruction. *Med Times Gaz* **1** (1872): 363

15. Buckman, R.F. Jr., Buckman, P.D., Hufnagel, H.V., Gervin, A.S. : A physiologic basis for the adhesion-free healing of deperitonealized surfaces. *J Surg Res* **20** (1976): 67-76

16. Burridge, K., Fath, K, Kelly, T., Nuckolls, G., Turner, C.: Focal adhesions: transmembrane junction between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **4** (1988) 487-525

17. Calvete, J.J., Schafer, W., Mann, K., Henschen, A., Gonzalez-Rodriguez, J.: Localization of the cross-linking sites of RGD and KQAGDV peptides to the isolated fibrinogen receptor, the human platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa. Influence of the peptide length. *Eur J Biochem* **206** (3) (1992): 759-765

18. Childs, W.A., Phillips, R.B.: Experience of intestinal plication and a proposed modification. *Ann Surg* **152** (1960): 285

19. De Lande, D.C.D., Jeekel, J.: Prevalence of adhesions and the associated costs in general surgery. In: *Peritoneal Surgery*, 307-320; Hrsg. Di Zerega GS, Springer Verlag 2000.
20. De Stoooper, B., Van der Schueren, B., Jaspers, M., Saison, M., Spaepen, M., Van Leuven, F., Van den Berghe, H., Cassiman, J.J.: Distribution of the beta 1 subgroup of the integrins in human cells and tissues. *J Histochem Cytochem* **37** (1989): 299 - 307
21. Dennis, C.: The gastrointestinal sump tube. *Surgery* **66** (1969): 309
22. Di Zerega, G.S.: Contemporary adhesion prevention. *Teril Steril* **61** (1994): 219
23. Drollette, C.M., Badawy, S.Z.: Pathophysiology of pelvic adhesions. Modern trends in preventing infertility. *J Reprod Med* **37** (1992): 107
24. Elices, M.J., Urry, L.A., Hemler, M.E.: Receptor functions for the integrin VLA – 3: Fibronectin, Collagen and Laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. *J Cell Biol* **112** (1991): 169 - 181
25. Ellis, H.: *Intestinal obstruction*. New York : Appleton-Century-Crofts, 1982
26. Evans, D.M., McAree, K., Guyton, D.P., Hawkins, N., Stakleff, K.: Dose dependency and wound healing aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intra-abdominal adhesions. *Am J Surg* **165** (1993): 229
27. Galati, R., Verdina, A., Falasca, G. and Chersi, A.: Increased Resistance of Peptides to Serum Proteases by Modification of their Amino Groups. *Z. Naturforsch* **58c** (2003) : 558-561
28. Giancotti, F.G., Ruoslahti, E.: Integrin Signaling. *Science* **285** (1999):1028-1032
29. Grant, D.S., Kleinman, H.K.: Regulation of capillary formation by Laminin and other components of the extracellular matrix. *E X S* **79** (1997): 317-333

30. Gresham, H.D., Adams, S.P., Brown, E.J.: Ligand binding specificity of the leukocyte response integrin expressed by human neutrophils. *J Biol Chem* **267** (20) (1992): 13895-902
31. Guan, J.L., Hynes, R.O.: Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor $\alpha_4\beta_1$. *Cell* **60** (1990): 53 – 61
32. Hall, D.E., Reichardt, L.F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A., Damsky, C.H.: The $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_6\beta_1$ Integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites of Laminin. *J Cell Biol* **110** (1990): 2175 - 2184
33. Hees, H.: Kreislaufsystem. In: Histologie H. Hees, F. Sinowatz, Hrsg. Deutscher Ärzte Verlag, Köln (2000): 191-204
34. Heicappell, R.: Adhäsionsmoleküle bei urologischen Tumoren. *Urologe A* **35** (1996): 363-69
35. Hyacinthe, L.M., Jarrett, T.W., Gordon, C.S., Vaughan, E.D. Jr., Whalen, G.F.: Inhibition of bladder tumor cell implantation in cauterized urothelium, without inhibition of healing, by a fibronectin-related peptide (GRGDS). : *Ann Surg Oncol* **2** (5,1995) : 450-56
36. Hynes, R.O.: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* **48** (1987): 549-554
37. Hynes, R.O.: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69** (1992): 11-25
38. Hynes, R.O.: The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol* **23** (2004): 333-340
39. Hynes, R.O.: A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature Medicine* **9** (8) (2002): 918 – 921

40. Jackson, D.Y., Quan, C., Artis, D.R., Rawson, T., Blackburn, B., Struble, M., Fitzgerald, G., Chan K., Mullins, S., Burnier, J.P., Fairbrother, W.J., Clark, K., Berisini, M., Chui, H., Renz, M., Jones, S., Fong, S.: Potent $\alpha 4\beta 1$ peptide antagonists as potential anti-inflammatory agents. *J Med Chem* **40** (1997): 3359 – 3368

41. Juliano, R.L., Haskill, S.: Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **120** (1993): 577 – 585

42. Kanda, S., Kuzuya, M., Ramos, M.A., Koike, T., Yoshino, K., Ikeda, S., Iguchi, A.: Matrix Metalloproteinase an $\alpha v\beta 3$ Integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20** (2000): 998-1005

43. Kern, E., Kuhbier, C.: Entstehung, Klink, Therapie und Prophylaxe der peritonealen Adhäsionen. *Ergebn Chir Orthop* **156** (1964): 48

44. Komoriya, A., Green, L.J., Mervic, M., Yamada, S.S., Yamada, K.M., Humphries, M.J.: The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem* **266** (23) Aug(1991): 15075-15079

45. Laberge, S., Rabb, H., Issekutz, T.B., Martin, J.G.: Role of VLA-4 and LFA-1 in allergen induced airway hyperresponsiveness and lung inflammation in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **151** (1995): 822 – 829

46. Leavesley, P.I., Ferguson, G.D., Wayner, E.A., Cheresh, D.A.: Requirement of the integrin β_3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibronectin. *J Cell Biol* **117** (1992): 1101 – 1107

47. Li, C., McCarthy, J.B., Furcht, L.T., Fields, G.B.: An All-D Amino Acid Peptide Model of $\alpha 1(\text{IV})$ 531-543 from Type IV Collagen Binds the $\alpha_3\beta_1$ Integrin and Mediates Tumor Cell Adhesion, Spreading and Motility. *Biochemistry* **36**, 49 (1997):15404 - 15410

48. Liotta, L.A.: Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American* **266** (2)(1992): 62-63
49. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L., Darnell, J.: *Molecular Cell Biology*, 5th Edition. WH Freeman (2003)
50. McKeown-Longo, P.J.: Fibronectin-Cell Surface Interactions. *Rev Infec Dis* **9** (1987): 322-34
51. Menzies, D., Ellis, H.: Intestinal obstruction from adhesions – How big is the problem ? *Ann R Coll Surg Engl* **72** (1990): 60-63
52. Meredith, J.E., Fazeli, B., Schwartz, M.A.: The extracellular matrix as a survival factor. *Mol Biol Cell* **4** (1993): 953-961
53. Müller, S.A., Treutner, K.H., Tietze, L., Anurov, M., Titkova, S., Polivoda, M., Oettinger, A.P., Schumpelick, V.: Influence of intraperitoneal phospholipid dosage on adhesion formation and wound healing at different intervals after surgery. *Langenbeck's Arch Surg* **386** (2001a): 278 - 284
54. Muller, S.A., Treutner, K.H., Tietze, L., Anurov, M., Titkova, S., Polivoda, M., Oettinger, A.P., Schumpelick, V.: Efficacy of adhesion prevention and impact on wound healing of intraperitoneal phospholipids. *J Surg Res* **96** (1); (2001b): 68-74
55. Nemir, P.: Intestinal obstruction: ten-year survey at the Hospital of the University of Pennsylvania. *Ann Surg* **135** (1952): 367-71
56. Noble, T.B.: Plication of small intestine as prophylaxis against adhesions. *Am J Surg* **35** (1937): 41
57. Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.C., Hsieh, J.T.: Cell adhesion proteins as tumor suppressors. *J Urol* **167** (Apr 2002): 1836-43

58. Ott, D.E. The Peritoneum and laparoscopy. In: *Peritoneal Surgery*, 175-181; Hrsg. DiZerega GS, Springer Verlag 2000
59. Payr, E.: Biologisches zur Entstehung, Rückbildung und Vorbeugung von Bauchfellverwachsungen. *Zentralbl Gynäkol* **14** (1924): 718
60. Perry, J.F., Smith, G.A. and Yonchiro, E.G.: Intestinal obstruction caused by adhesions; a review of 388 cases. *Ann Surg* **142** (1955): 810-16
61. Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309** (1984): 30-33
62. Pignatelli, M., Vessey, C.J.: Adhesion molecules: Novel Molecular Tools in Tumor Pathology. *Hum Pathol* **25** (1994): 849-856
63. Playforth, R.H., Holloway, J.B. and Griffen, W.O. : Mechanical small bowel obstruction. *Ann Surg* **171** (1970): 783–788
64. Podalski, D.K.: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **325** (1991): 928–937
65. Powrie, F., Leach, M.W.: Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation. *The Immunol* **2** (1995): 115-123
66. Raf, L.E.: Causes of abdominal adhesions in cases of intestinal obstruction. *Acta Chir Scand* **135** (1969) : 73-76
67. Rennard, S.I., Jaurand, M.C., Bignon, J., Kawanami, O., Ferrans, V.J., Davidson, J., Crystal, R.G. : Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung. *Am Rev Respir Dis* **130** (1984): 267-74
68. Renvall, S., Lehto, M., Penttinen, R.: Development of peritoneal fibrosis occurs under the mesothelial cell layer. *J Surg Res* **43** (1987) 407-412

69. Richter, H. Adhesion prophylaxis : treatment with tube splints. *Langenbecks Arch Chir* **347** 1978 Nov: 401-2
70. Ruoslahti, E., Engvall, E.: Complexing of fibronectin glycosaminoglycans and collagen. *Biochim Biophys Acta* **631**(1980): 350-58
71. Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D.: Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. *Cell* **44** (1986): 517-518
72. Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238** (1987): 491-97
73. Ruoslahti, E.: RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12** (1996): 697-715
74. Ruoslahti, E.: The RGD story: a personal account. *Matrix Biol* **22** (2003): 459-465
75. Rupp, P.A., Little, C.D.: Integrins in vascular development. *Circ Res* **89** (2001): 566-72
76. Saltzman, A.K., Olson, T.A., Mohanraj, D., Carson, L.F. and Ramakrishnan, S.: Prevention of postoperative adhesions by an antibody to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in a murine model. *Am J Obstet Gynecol* **174** (1996): 1502-6
77. Smyth, S. S., Joneckis, C.C., Parise, L.V.: Regulation of vascular integrins. *Blood* **81** (11)(1993): 2827-43
78. Snoj, M., Ar'Rajab, A., Ahren, B., Bengmark, S.: Effect of phosphatidylcholine on postoperative adhesions after small bowel anastomosis in the rat. *Br J Surg* **79**(1992): 427
79. Stewardson, R.H., Bombeck, T. and Nyhus, L.M.: Critical operative management of small bowel obstruction. *Ann Surg* **187** (1978): 189-93

80. Storgard, C.M., Stupack, D.G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., Fox, R.I., Cheresh, D.A.: Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with $\alpha v \beta 3$ antagonist. *J Clin Invest* **103** (1999): 47 - 54
81. Sundaram, R., Dakappagari, N.K. and Kaumaya, P.T.: Synthetic peptides as cancer vaccines. *Biopolymers* **66** (2002): 200-216
82. Suzuki, N., Yokoyama, F., Nomizu, M.: Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect Tissue Res* **46** (3) (2005): 1 – 11
83. Swolin, K.: Experimentelle Studien zur Prophylaxe von intra-abdominellen Verwachsungen. *Acta Obstet Gynecol Scand* **45** (1966): 473-98
84. Treutner, K.H., Bertram, P., Lerch, M., Klimaszewski, M, Petrovic-Källholm, S, Sobesky, J., Winkeltau, G., Schumpelick, V.: Prevention of postoperativ adhesions by single intraperitoneal medication. *J Surg Res* **59** (1995) : 764-771
85. Treutner, K.H., Müller, S.A., Jansen, M., Schumpelick, V.: Inzidenz, Komplikationen und Prophylaxe postoperativer peritonealer Adhäsionen. *Viszeralchirurgie* **36** (2001): 396-401
86. Van der Flier, A., Sonnenberg, A.: Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305** (3)(Sep 2001): 285-95
87. Von Dembowski, T.: Über die Ursachen der peritonealen Adhäsionen nach chirurgischen Eingriffen mit Rücksicht auf die Frage des Ileus nach Laparotomien. *Langenbecks Arch Chir* **37**(1889): 745
88. Vipond, M.N., Whawell, S.A., Thompson, J.N., Dudley, H.A.: Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet* **335** (1990): 1120-1122
89. Wayner, E.A. und Kovach, N.L.: Activation –dependent recognition by hematopoietic cells of the LDV sequence in the V region of fibronectin. *J Cell Biol* **116** (1992): 489 – 497

90. Weibel, M.A., Majno, G.: Peritoneal Adhesions and there relation to abdominal surgery. *Am J Surg* **126** (1973): 345-353
91. Westlin, W.F.: Integrins as target for angiogenesis inhibition. *Cancer J* **7** (2001): 139-143
92. Whalen, G.F., Ingber, D.E.: Inhibition of tumor-cell attachment to extracellular matrix as a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound. *Ann Surg* **210** Dec 1989: 758 – 764
93. Yamada, K.M., Kennedy, D.W., Yamada, S.S., Gralnick, H., Chen, W.-T., Akiyama, S.K.: Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res* **50** (1990): 4485 - 4496
94. Yen, C.J., Fang, C.C., Chen, Y.M., Lin, R.H., Wu, K.D., Lee, P.H., Tsai, T.J.: Extracellular Matrix Proteins modulate HPMC behavior. *Nephron* **75** (1997): 188 – 195
95. Zutter, M.M., Mazoujian, G., Santoro, S.A.: Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am J Pathol* **137** (1990): 863 - 870

VII Anhang

Photographische Dokumentation der Adhäsionsinhibition in vivo.

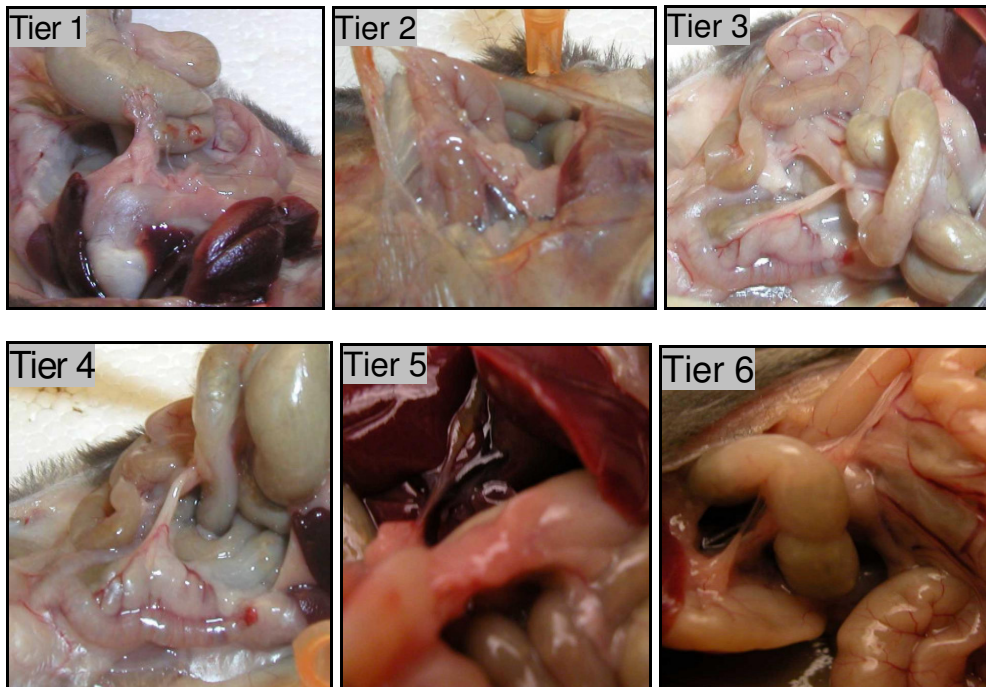


Abb. 15: Adhäsionsinhibition in vivo, Spülung mit Kochsalzlösung
Spülung mit Kochsalzlösung. Tier 1, 2 und 6 multiple Adhäsionen; Tier 3 und 4 fibröse Adhäsionen; Tier 5 oberflächliche Adhäsionen.

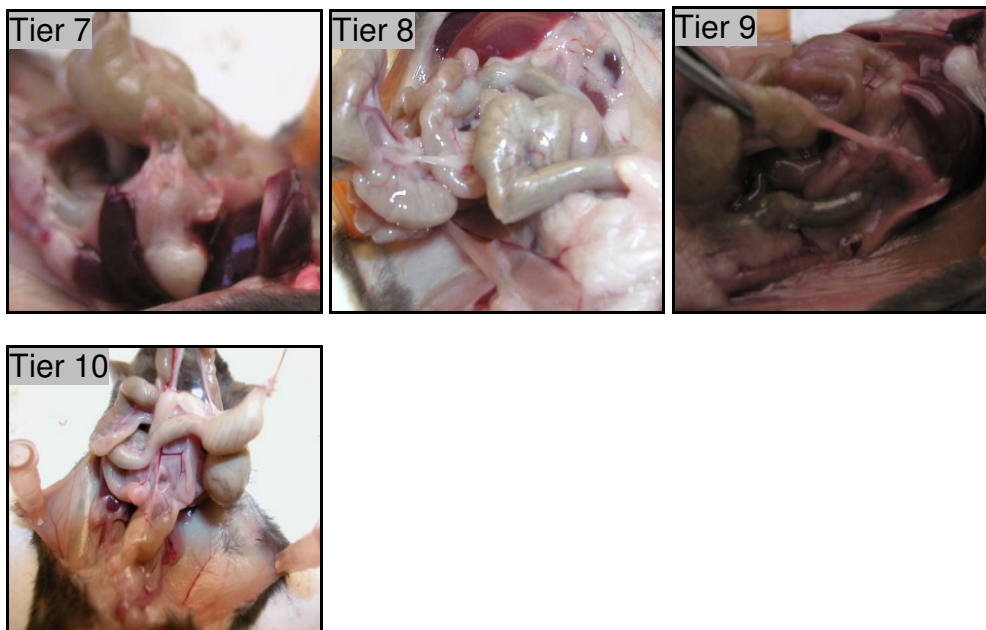


Abb. 16 Adhäsionsinhibition in vivo, Spülung mit Oligopeptiden
Spülung mit Oligopeptiden (GRGDS, EILDV, KQAGDV). Tier 7 multiple Adhäsionen, 8 und 9 fibröse Adhäsionen und Tier 10 keine Adhäsionen.



Abb. 17: Adhäsionsinhibition in vivo, Spülung mit modifizierten Oligopeptiden
Spülung mit modifizierten Oligopeptiden (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV). Tier 11, 12 und 13 oberflächliche Adhäsionen.

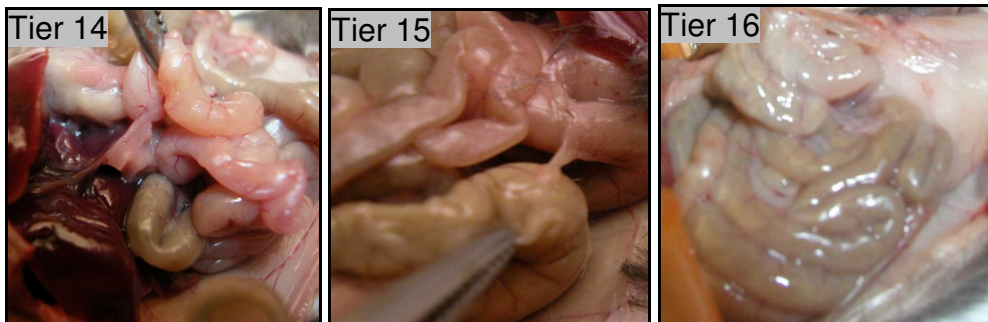


Abb. 18: Adhäsionsinhibition in vivo, Spülung mit Phospholipid
Spülung mit Phospholipid. Tier 14, 15 und 16 oberflächliche Adhäsionen.

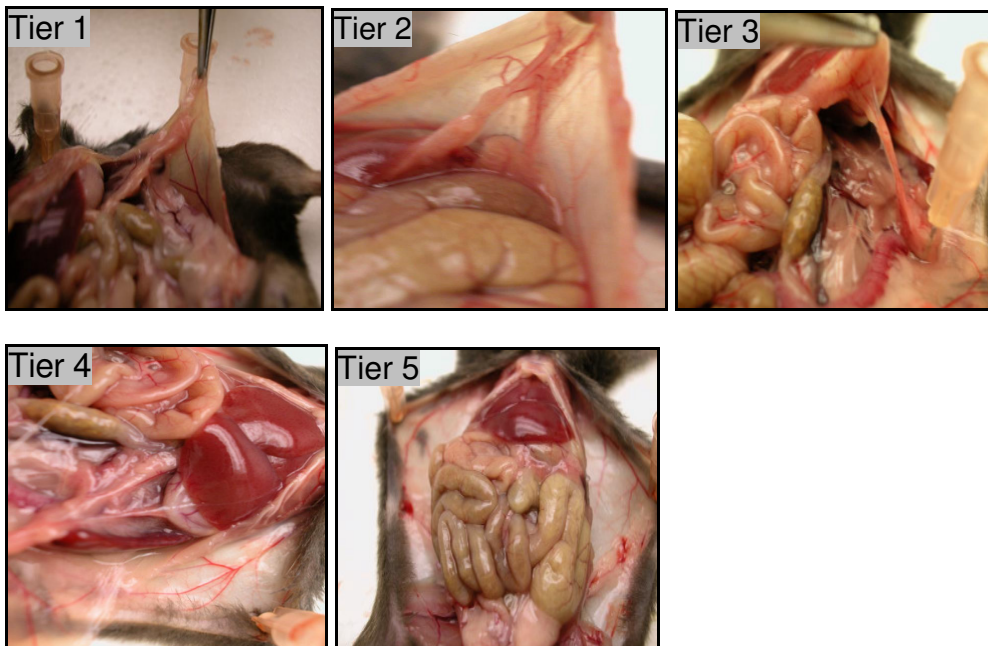


Abb. 19: Adhäsionsinhibition Oligopeptidspülung. Kontrollgruppe
Spülung mit Kochsalzlösung. Tier 1 und 2 multiple Adhäsionen, Tier 3 fibröse Adhäsionen, Tier 4 oberflächliche Adhäsionen, Tier 5 keine Adhäsionen.



Abb. 20: Adhäsionsinhibition Oligopeptidspülung. Spülung mit Oligopeptiden (GRGDS, EILDV, KQAGDV). Tier 6 und 7 multiple Adhäsionen, Tier 8 keine Adhäsionen.



Abb. 21: Adhäsionsinhibition Oligopeptidspülung. Modifizierte Oligopeptide Spülung mit modifizierten Oligopeptiden (modGRGDS, modEILDV, modKQAGDV). Tier 9, 10 und 11 ohne Adhäsionen.

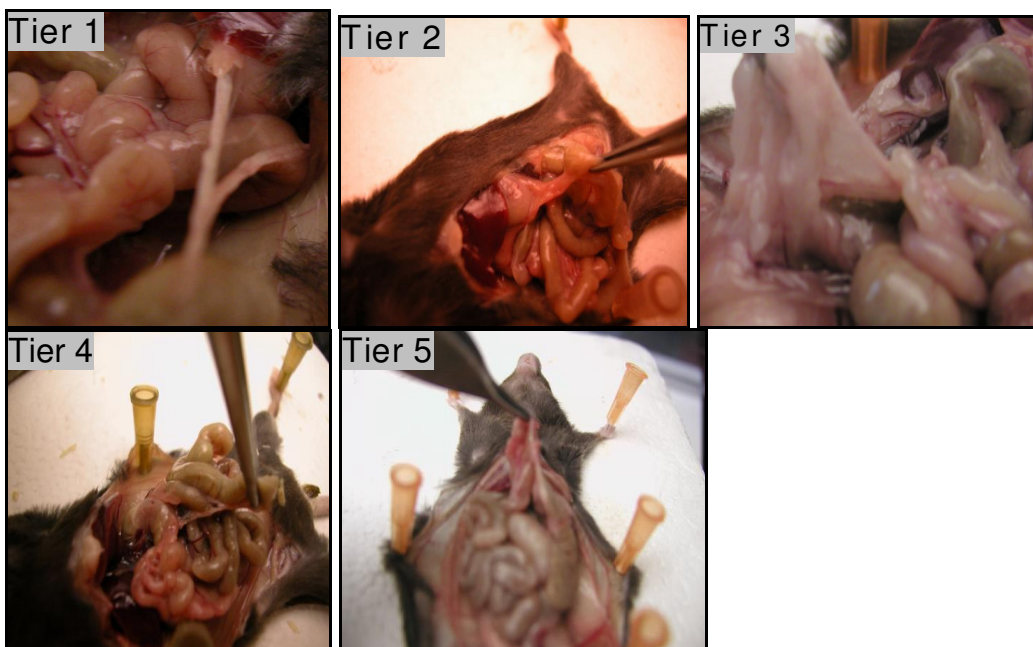


Abb. 22: Adhäsionsinhibition Phospholipide. Kontrollgruppe Spülung mit Kochsalzlösung. Tier 1, 2, 3 multiple, Tier 4 und 5 fibröse Adhäsionen.

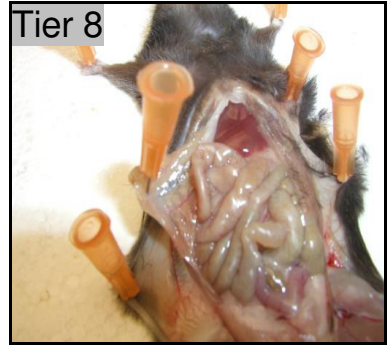
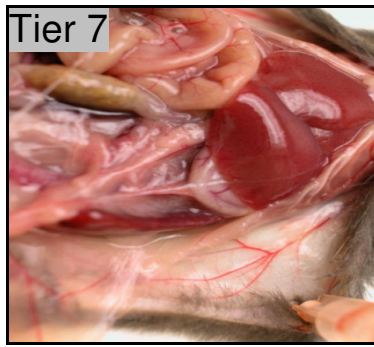
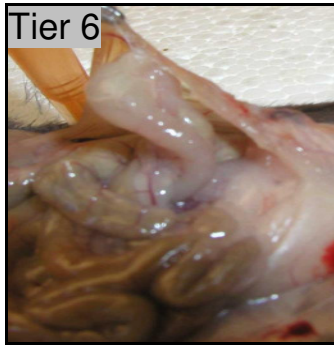


Abb. 23: Adhäsionsinhibition Phospholipidspülung. Spülung mit Phospholipid

Spülung mit Phospholipid, n=3. Tier 6 multiple Adhäsionen, Tier 7 oberflächliche Adhäsionen, Tier 8 keine Adhäsionen.

VIII Abkürzungen

CDS	Cell Dissociation Solution
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	foetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Gauge
gr	Gramm
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IE	internationale Einheiten
λ	Lambda, Wellenlänge
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
RPMI	„Rosewell Memorial Park Institut“- Medium
SD	Standardabweichung

IX Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Jocham, Direktor der Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, für die freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Böhle, ehemals lfd. Oberarzt der Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, seinen steten Rat und seine Unterstützung, die er mir bei der Anfertigung der Dissertation gewährte. Die engagierte und umfassende fachliche Betreuung haben im wesentlichen zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Für die Unterstützung in der praktischen Durchführung dieser Arbeit danke ich Frau Kirsten Brudereck, geb. Sellmann, ehemals MTA aus der Klinik für Urologie der Medizinischen Universität zu Lübeck. Ich danke insbesondere für die Kultivierung und Präparation der verwendeten Zelllinien, die Unterstützung bei der Durchführung der Zelladhäsionsassays, die fürsorgliche Betreuung und das immer währende nette Klima im urologischen Forschungslabor.

Ich danke meinen Eltern, Brüdern und Leo für die ständige und stets liebevolle Unterstützung und Ermunterung zur Weiterführung und Vollendung dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen namentlich hier nicht aufgeführten Freunden und Bekannten bedanken, die mich in der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

X Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Blietz
Vorname: Caroline Elisa
Geburtsdatum/-ort: 18.10.1970/ Bremen

Schulbildung:

1977– 1981 Grundschole in Horn, Bremen
1981- 1990 Gymnasium Horn am Vorkampsweg, Bremen
Abitur 06/1990

Hochschulbildung:

1991-1999 Studium der Humanmedizin an der
Georgia Augusta Universität in Göttingen
08/1993 Ärztliche Vorprüfung
08/1994 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/1997 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/1998-03/1999 Praktisches Jahr
Chirurgie: Kantonales Spital Sursee, Schweiz,
Chefarzt Dr. Gonzenbach
Innere Medizin: Kantonales Spital Sursee, Schweiz,
Chefarzt Dr. Locher
Wahlfach: Pädiatrie, Krankenhaus Links der Weser,
Bremen, Chefarzt Prof. Dr. Bachmann
04/1999 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

06/1999 – 12/1999 Assistenzärztin, Abteilung für Chirurgie
Kantonales Spital Sursee, Schweiz,
Chefarzt Dr. Gonzenbach
03/2000 – 08/2001 Ärztin im Praktikum, Abteilung für Chirurgie
Marienkrankenhaus Hamburg,
Chefarzt Prof. Dr. Buchholz

seit 09/2001

Assistenzärztin, Klinik für Urologie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham

Promotion:

06/2002

Beginn der experimentellen Arbeit

XI Publikationen

Poster-Publikationen

Inhibition of peritoneal adhesion by oligopeptides, a new therapeutical approach.

Blietz, C.E., Sellmann, K., Böhle, A.

7th international Uro Oncological Immunotherapy Symposium 2002

Einsatz von integrinblockierenden spezifischen Oligopeptiden zur Adhäsionsinhibition von Fibroblasten in vitro und in vivo.

Blietz C.E., Böhle A.

16. Symposium für Experimentelle Urologie 2004

Prevention of peritoneal adhesion by specific integrin blocking oligopeptides in vitro and in vivo

Blietz C.E., Jocham, D., Böhle A.

Manuskript in Vorbereitung