

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

DAS ISCHÄMISCHE ZEITFENSTER VON EKTOPEM ENDO- METRIUM BESTIMMT SEINE FÄHIGKEIT ZUR AUSBIL- DUNG VON ENDOMETRIOSEHERDEN

**Eine experimentelle in vivo Studie im Endometriosemodell der
Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2022

vorgelegt von Sarah Isabelle Huwer
geb. am 22.12.1989 in Homburg/Saar

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	Endometriose	5
3.1.1	Definition, Symptomatik und Diagnostik der Endometriose	5
3.1.2	Epidemiologie und Historie	6
3.1.3	Organbefall und Stadieneinteilung	7
3.1.4	Endometriose und Sterilität	8
3.1.5	Therapie der Endometriose	9
3.1.6	Pathogenese der Endometriose	10
4	ZIEL DER STUDIE	14
5	MATERIAL UND METHODEN	15
5.1	Versuchstiere	15
5.2	Bestimmung des Zyklusstadiums	15
5.3	Gewinnung von Uterusgewebe	16
5.4	Präkultivierung des Uterusgewebes	18
5.5	Induktion intraperitonealer Endometrioseherde	18
5.6	Größenentwicklung der Endometrioseherde	19
5.6.1	Hochauflösende Ultraschallmessung	19
5.6.2	Größenmessung der Endometrioseherde mittels digitalen Messschiebers	21
5.7	Das Modell der Rückenhautkammer	22
5.7.1	Präparation der Rückenhautkammer.....	22
5.7.2	Transplantation der Endometriumfragmente	24
5.8	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	25
5.8.1	Funktionelle Kapillardichte und Flächenmessung	26
5.9	Histologie und Immunhistochemie	26
5.9.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	26
5.9.2	Ki67-Färbung	27
5.9.3	Cleaved Caspase-3 (Casp-3)-Färbung	27

5.9.4	CD31-Färbung	28
5.9.5	CD31/GFP-Doppelfärbung	28
5.9.6	Immunzellfärbung	29
5.10	Protein-Array	29
5.11	Experimentelles Protokoll	30
5.11.1	Studienabschnitt I: Charakterisierung präkultivierter Uterusfragmente	30
5.11.2	Studienabschnitt II: Modell der intraperitonealen Endometriose	31
5.11.3	Studienabschnitt III: Modell der Rückenhautkammer	32
5.12	Statistik.....	33
6	ERGEBNISSE	34
6.1	Charakterisierung präkultivierter Uterusfragmente	34
6.1.1	Morphologie und Zelldichte	34
6.1.2	Mikrogefäßdichte	35
6.1.3	Apoptoserate	36
6.1.4	Protein-Array.....	37
6.2	Auswirkungen einer Präkultivierung auf die Entwicklung intraperitonealer Endometrioseherde.....	40
6.2.1	Wachstum der Endometrioseherde	41
6.2.2	Vaskularisierung der Endometrioseherde	44
6.2.3	Proliferation und Apoptose in den Endometrioseherden	45
6.2.4	Entzündungsprozesse im Gewebe	46
6.3	Endometriose in der Rückenhautkammer	47
6.3.1	Vaskularisierung und Größenentwicklung der Endometrioseherde	47
7	DISKUSSION	50
7.1	Diskussion der Methoden	50
7.2	Diskussion der Ergebnisse	53
7.3	Schlussfolgerungen	57
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	58
9	DANKSAGUNG.....	73

10 **LEBENS LAUF**.....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
11 **PUBLIKATION**76

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Endometriose ist definiert als das Vorkommen von Endometrioseherden außerhalb des Cavum uteri. Peritoneale Endometrioseherde entstehen hauptsächlich durch retrograde Menstruation. Hierbei wird während der Menstruation abgestoßenes Endometrium durch die Tuben in den Bauchraum transportiert. Dort kann das Gewebe adhären, proliferieren und am Peritoneum anwachsen.

Die retrograde Menstruation ist ein physiologischer Prozess, welcher bei bis zu 90 % aller Frauen nachweisbar ist. Es haben jedoch deutlich weniger Frauen eine Endometriose. Somit scheinen noch andere Kofaktoren bei der Entstehung der Krankheit notwendig zu sein. Dabei ist zu bedenken, dass die in vivo Passage von Endometriumfragmenten aus dem Uterus durch die Tuben in die Peritonealhöhle einige Stunden bis Tage dauern kann. Während dieser Zeit sind die Fragmente avaskulär und hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Unklar ist, wie dieser Zustand die Viabilität, Proliferation, Angiogenese, Entzündungsaktivität und schließlich die Fähigkeit, einen Endometrioseherd auszubilden, beeinflusst.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, wie das ischämische Zeitfenster zwischen Entnahme und peritonealem Kontakt von Endometrium die Entstehung, Größenentwicklung, Angiogenese, Apoptose und Immunzellinfiltration von induzierten Endometrioseherden beeinflusst.

Hierzu wurden in einem ersten Studienabschnitt Uterusfragmente von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen, deren Gewebe green fluorescent protein (GFP)-positiv ist, isoliert und entweder direkt nach der Entnahme oder nach einer Präkultivierung von 24h oder 72h histologisch und immunhistochemisch untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zell- und Mikrogefäßdichte 72h-präkultivierter Uterusfragmente im Vergleich zu frisch isolierten und 24h-präkultivierten Fragmenten signifikant erniedrigt und die Apoptoserate signifikant erhöht ist. Zusätzlich wurde ein Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese-Array zur Detektion von Angiogenese-relevanten Proteinen durchgeführt. Sowohl in frischen als auch in präkultivierten Uterusfragmenten wurden alle untersuchten Proteine exprimiert. Jedoch zeigten die präkultivierten Uterusfragmente ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster angiogeneserelevanter Proteine gegenüber dem frisch entnommenen Gewebe.

In einem zweiten Studienabschnitt wurden frisch isolierte und präkultivierte Uterusfragmente von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen an die Bauchwand weiblicher C57BL/6-Mäuse transplantiert. Die Größenentwicklung der so induzierten Endometrioseherde wurde über 28 Tage mittels hochauflösender Ultraschallbildgebung untersucht. Am Ende des Versuchs wurden die Herde entnommen und für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen asserviert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung von Endometrioseherden aus 72h-präkultivierten Uterusfragmenten nahezu vollständig ausblieb. Weiterhin hemmte eine Präkultivierung über 24h die Entstehung von Endometrioseherden. Jedoch wurde das Wachstum einzelner Herde gefördert. Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden, dass die Mikrogefäßdichte sowie der Anteil GFP-positiver Blutgefäße und die Apoptoserate in Herden aus frisch isolierten und 24h-präkultivierten Fragmenten vergleichbar war, der Anteil proliferierender Stromazellen in Herden der 24h-präkultivierten Fragmente jedoch signifikant erhöht. Des Weiteren zeigte sich in den präkultivierten Uterusfragmenten ein signifikant geringerer Anteil an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.

In einem dritten Studienabschnitt wurden frisch isolierte sowie 24h- und 72h-präkultivierte Endometriumfragmente im Modell der Rückenhautkammer mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass eine Präkultivierung über 24h die Vaskularisierung von Endometriumfragmenten fördert, während fast alle 72h-präkultivierten Endometriumfragmente keine Endometrioseherde mehr ausbilden konnten.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die durch eine Präkultivierung verursachte Gewebhypoxie einen wesentlichen Einfluss auf die Integrität, das Überleben sowie die angiogene und proliferative Aktivität von ektopem Endometrium hat. Nach 72h Präkultivierung regrediert das Gewebe nahezu vollständig und ist nicht mehr in der Lage anzuwachsen und sich zu Endometrioseherden zu entwickeln. Im Gegensatz dazu fördert die 24h avaskuläre Periode die Überexpression von angiogenen Wachstumsfaktoren im Gewebe, was zur Ausbildung von Endometrioseherden mit aggressiverem Wachstum führt. Daher könnte die Dauer des ischämischen Zeitfensters einen wichtigen Selektionsfaktor für ektopes Endometrium darstellen, der die Entwicklung von Endometrioseherden innerhalb der Peritonealhöhle bestimmt.

2 SUMMARY

Endometriosis is defined as the presence of endometriotic lesions outside the uterine cavity. The primary cause of peritoneal endometriosis is retrograde menstruation. During menstruation, shed endometrium is retrogradely transported through the fallopian tubes into the peritoneal cavity. There, the tissue can adhere and proliferate and engraft into the peritoneum.

Retrograde menstruation is a physiological process, which occurs in up to 90 % of women. However, considerably less women suffer from endometriosis. Thus, other cofactors seem to be necessary to the development of the disease. In this context, it should be considered that in women the passage of shed endometrial fragments from the uterus into the peritoneal cavity and their final engraftment may require several hours to days. During this period, the fragments are avascular and exposed to hypoxic conditions. By now, it is completely unknown, how this affects the survival, proliferation, angiogenesis and inflammatory activity of the tissue and, hence, its ability of developing into endometriotic lesions.

Therefore the aim of the present thesis was to analyze, how the ischemic time window between the explantation and peritoneal contact of endometrium determines the formation, growth, angiogenesis, apoptosis and immune cell infiltration of induced endometriotic lesions.

In a first part of the thesis, uterine fragments from transgenic C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J mice with green fluorescent protein (GFP)-positive tissue were examined directly after their isolation or after precultivation for 24h or 72h by means of histology and immunohistochemistry. The cell density and microvessel density were significantly lower and the apoptosis rate was significantly higher in 72h-precultivated fragments when compared to freshly isolated and 24h-precultivated ones. In addition, a proteome-profiler-mouse-angiogenesis-array was performed to detect angiogenesis-related proteins. All analyzed proteins were detectable in cultivated and non-cultivated uterine fragments. However, the precultivated fragments exhibited a considerably different protein expression pattern when compared to the freshly isolated ones.

In a second part of the thesis, freshly isolated and precultivated uterine fragments of C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)¹Os/J-mice were transplanted to the abdominal wall of female C57BL/6 mice. To analyze the growth of these grafts, high-resolution ultrasound imaging was performed repetitively over 28 days. At the end of the observation period, the endometriotic lesions were excised for further histological and immunohistochemical analyses. It was found that the development of 72h-precultivated uterine fragments into endometriotic lesions was markedly suppressed. Furthermore, a precultivation for 24h also inhibited the development of endometriotic lesions. However, it promoted the growth of individual lesions. The microvessel density, the fraction of GFP-positive blood vessels and the rate of apoptosis were comparable in lesions developing from freshly isolated and 24h-precultivated fragments, whereas stromal cells showed a significantly higher proliferation rate in lesions of the 24h-precultivated grafts. The number of macrophages and granulocytes was significantly lower in lesions of precultivated uterine fragments.

In a third part of the thesis, freshly isolated as well as 24h- and 72h-precultivated endometrial fragments were analyzed in the dorsal skinfold chamber model by means of intravital fluorescence microscopy. By this, it could be shown that precultivation of endometrial fragments for 24h promotes their vascularization. In contrast, most of the 72h-precultivated endometrial fragments were not able to develop into endometriotic lesions.

In summary, the present thesis demonstrates that hypoxia induced by precultivation has a strong impact on the integrity, survival as well as the angiogenic and proliferative activity of ectopic endometrium. After 72h of precultivation, the tissue completely regresses and is no longer capable of engrafting and developing into endometriotic lesions. In contrast, an only 24h avascular period promotes the overexpression of angiogenic growth factors in the tissue, leading to the formation of endometriotic lesions which exhibit an aggressive growth behaviour. Therefore, it can be concluded that the duration of the ischemic time window may represent an important selection factor for ectopic endometrium, which determines the development of endometriotic lesions within the peritoneal cavity.

3 EINLEITUNG

3.1 Endometriose

3.1.1 Definition, Symptomatik und Diagnostik der Endometriose

Die Endometriose ist definiert als das Vorkommen endometriumartiger Zellverbände, bestehend aus funktionalen Stroma- und Epithelzellen, außerhalb des Cavum uteri (ZONDERVAN et al., 2020). Unterbauchschmerz ist eines der Leitsymptome der Erkrankung. Weiterhin leiden die Patientinnen häufig an Sterilität (GIUDICE, 2010; ULRICH et al., 2014).

Zwischen dem Ausmaß der Endometriose und der Art und Stärke der Symptome besteht nur ein loser Zusammenhang, wobei ein großer Teil der Frauen mit Endometriose asymptomatisch ist (GRUPPO ITALIANO PER LO STUDIO DELL' ENDOMETRIOSI, 2001). Fast jede Frau mit symptomatischer Endometriose leidet unter Dysmenorrhö. Diese Symptomatik kann von der Lokalisation der Endometrioseherde abhängen. Es gibt z.B. einen Zusammenhang zwischen Dysmenorrhö und dem Vorhandensein von Adhäsionen im Douglasraum. Weiterhin korreliert das Ausmaß einer Dyspareunie mit dem Befall der uterosakralen Ligamente (FAUCONNIER et al., 2002). Die tief infiltrierende Endometriose kann zu deutlichen und oft erheblichen Krankheitssymptomen führen. Sie ist als Befall des Septum retrovaginale, des Fornix vaginae, des Retroperitoneums (Beckenwand, Parametrium), des Darms, des Ureters und der Harnblase definiert (ULRICH et al., 2014). Dyspareunie kann auch durch Schädigung des Plexus pelvicus bedingt sein (POSSOVER, 2009). Bei Darmbefall kann es zu den Symptomen Dyschezie, Druckgefühl, Blähungen, Tenesmen, Hämatochezie, Diarrhö und Obstipation (im Wechsel) kommen (ULRICH et al., 2014). Die Blasenendometriose kann zu Dys- und Hämaturie führen, eine Ureterendometriose zur Hydronephrose. Da der Harnstau sich langsam entwickelt, ist er meist symptomarm bis asymptomatisch (SORIANO et al., 2011).

Indikationen zur Endometriosedagnostik sind anhaltende Schmerzen und/oder unerfüllter Kinderwunsch. Die Diagnose der tief infiltrierenden Endometriose wird zunächst klinisch gestellt. Obligate Untersuchungen sind die vaginale und rektale Palpation, vaginale Sonographie und transabdominale Nierensonographie (ABRAO et al., 2007; ULRICH et al., 2014). Eine Koloskopie ist bei Verdacht auf einen Rekto-

sigmoidbefall sinnvoll. Die Infiltration der Mucosa ist zwar sehr selten, aber 26 % der Patientinnen mit Rektumendometriose haben eine Stenose (ROMAN et al., 2012). Die Wandinfiltration des Rektums kann am besten endosonographisch beurteilt werden (BAZOT et al., 2009). In einer Vergleichsstudie über die verschiedenen bildgebenden Methoden wurde der Magnetresonanztomographie die höchste Sensitivität zugewiesen (BAZOT et al., 2009). Die peritoneale Endometriose kann letzten Endes nur laparoskopisch diagnostiziert werden (GARRY, 2004). Eine Endometriose der Ovarien (ovarielles Endometriom) kann durch die transvaginale Sonographie detektiert werden. Eine Unterscheidung von anderen, auch von malignen Prozessen, ist meist nur histologisch möglich (HUDELIST et al., 2009).

3.1.2 Epidemiologie und Historie

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen. Die Prävalenz der Erkrankung wird bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter auf 2 - 25 % geschätzt (MOGHISSI, 1999; OLIVE und PRITTS, 2001; GIUDICE und KAO, 2004). Dabei wird in unterschiedlichem Maße berücksichtigt, dass das Intervall zwischen ersten Symptomen und der definitiven Diagnose „Endometriose“ sehr lang ist. In Österreich und Deutschland beträgt es etwa 10 Jahre (HUDELIST et al., 2012). Die Häufigkeit einer Endometriose beträgt bei Patientinnen, die zur Abklärung einer Sterilität eine Pelviskopie erhalten 30 - 50 % (METTLER, 1995; WITZ und BURNS, 2002), bei asymptomatischen Patientinnen 2 - 18 % (SANGI-HAGHPEYKAR und POINDEXTER, 1995; MISSMER und CRAMER, 2003). In Deutschland werden pro Jahr etwa 20.000 Patientinnen wegen Endometriose zur Krankenhausbehandlung eingewiesen. Man schätzt die Anzahl der Neuerkrankungen auf 40.000 pro Jahr (HAAS et al., 2012).

Carl von ROKITANSKY (1860) gilt als Erstbeschreiber der Endometrioseerkrankung. Der Chirurg Thomas Stephen CULLEN (1920) beschrieb jedoch erstmals das komplette morphologische und klinische Bild der Erkrankung, die er Adenomyose nannte. Er entwickelte ein Schema mit den klassischen Lokalisationen der adenomyotischen Läsionen im Becken. Cullen erkannte, dass das Krankheitsbild durch ektopes, Endometrium-ähnliches Gewebe verursacht wird. John Albertson SAMPSON (1927) nannte das Krankheitsbild erstmals Endometriose. In den folgenden Jahren wurden pelvine Endometriose und Adenomyosis uteri als unabhängige Krankheitsbilder ge-

sehen. Sie wurden schließlich von NOVAK und de LIMA (1948) wieder zu einer nosologischen Entität zusammengeführt (BENAGIANO et al., 2014). Sechzig Jahre später präsentierten LEYENDECKER et al. (2009, 2015) ein Konzept speziell zur Pathogenese der Adenomyosis uteri, das als Ursache der Erkrankung die Verlagerung von Endometrium in die Uterusmuskulatur nach uteriner Autotraumatisierung in Folge der kontraktiven Aktivität des Organs sieht.

3.1.3 Organbefall und Stadieneinteilung

Die Endometriose befällt in Form proliferierender endometrialer Drüsen- und Stromazellen am häufigsten die Strukturen im kleinen Becken. In abnehmender Häufigkeit sind Beckenperitoneum, Ovarien (Abb. 1B), Ligamenta sacrouterina, Septum retrovaginale sowie extragenitale Organe (Abb. 1A; C) (Rektosigmoid und Harnblase) betroffen. Die Inzidenzen der Adenomyosis uteri und des Befalls der Tuben sind nicht genau bekannt (ULRICH et al., 2014). Seltene Endometrioselokalisierungen sind Zwerchfell (REDWINE, 2002), Wurmfortsatz des Blinddarms (GUSTOFSON et al., 2006) und Nabel (CLAAS-QUAX et al., 2015). Ein Endometriosebefall kann darüber hinaus und mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine intraoperative Zellimplantation in Operationsnarben auftreten, z.B. nach Hysterektomie, Sectio caesarea und Episiotomie oder nach Dammrissen unter der Geburt (BEKTAS et al., 2010; OZEL et al., 2012). Endometrioseherde in Milz, Leber, Nieren, Lunge, Nervensystem oder Skelett sind beschrieben aber ausgesprochen selten (RODGERS und FALCONE, 2008; CECCARONI et al., 2010; VISOULI et al., 2012; BOURAS et al., 2013; STEINBERG et al., 2014).

Die klassische Einteilung der Endometriose nach ihrer Lokalisation erfolgte durch Hans ALBRECHT (1955). Sie unterscheidet die Endometriosis genitalis interna, die Endometriosis genitalis externa und die Endometriosis extragenitalis. Zur Beurteilung des Schweregrades der Endometriosis genitalis externa wird in der Praxis meist die Einteilung der American Society for Reproductive Medicine (rASRM-Score, ASRM 1997) benutzt. Sie unterscheidet vier Schweregrade, in die Anzahl, Größe und Lokalisation der extragenitalen Endometrioseherde und darüber hinaus Infiltrationstiefe sowie Ausbildung von Adhäsionen eingehen. Dieser rASRM-Score zeigt jedoch nur eine schwache Korrelation mit den Kardinalsymptomen Schmerz und Sterilität (VERCELLINI et al., 1996; GUZICK et al., 1997). Die Stiftung für Endometriosefor-

schung entwickelte eine weitere Klassifizierung (ENZIAN-Klassifizierung, 2005; revidierte ENZIAN-Klassifizierung, 2012) speziell für die rectovaginale Endometriose als häufigste Form der tief infiltrierenden Form der Endometriose. Ähnlich dem rASRM-Score ist die ENZIAN-Klassifizierung morphologisch deskriptiv (TUTTLES et al., 2005). Die ENZIAN-Klassifizierung soll keine andere Klassifizierung ersetzen. Sie komplettiert die ASRM-Klassifizierung (HAAS et al., 2013).



Abbildung 1: Typisches Erscheinungsbild verschiedener Endometrioseherde. **A:** Schwarze über das Peritoneum der Blase verteilte Läsionen (schwarzer Pfeil). **B:** Endometriosezyste des Ovars. **C:** Endometrioseherde (schwarzer Pfeil) am Dünndarm (A, B: entnommen aus www.mic-zentrum-frankfurt.de, C: AL-TALIB und TULANDI, 2010).

3.1.4 Endometriose und Sterilität

Endometriose und Sterilität sind häufig assoziiert, ein kausaler Zusammenhang ist jedoch nicht nachgewiesen (ULRICH et al., 2014). Die Endometriose und insbesondere die Adenomyosis uteri gehen mit einer größeren Dicke des uterinen Junktionalzonenmyometriums einher (KUNZ et al., 2007). Letzteres ist das hormonabhängige funktionelle innere Myometrium, das ontogenetisch von den Müller-Gängen stammt. Frauen mit Endometriose zeigen signifikant häufigere und stärkere Junktionalzonenkontraktionen als Frauen ohne Endometriose und darüber hinaus ein anderes Kontraktionsmuster (BULLETTI und de ZIEGLER, 2006; KIDO et al., 2007). Für eine erfolgreiche Konzeption sollten die Junktionalzonenkontraktionen zum Zeitpunkt der Implantation minimal sein. Bei Endometriose-Patientinnen ist zudem der Mechanismus des schnellen Spermatozoentransports durch gerichtete Kontraktionen des Junktionalzonenmyometriums zum Zeitpunkt der Ovulation gestört. Weiterhin führt die inflammatorische Komponente der Endometriose zu Verwachsungen, die eine Veränderung der Motilität der Tuben bewirken (LEYENDECKER et al., 1996). Es gibt Hinweise, dass die Endometriose mit einer anomalen Mikrovaskularisierung einhergeht, was auch zu einer Infertilität beitragen könnte (KANG et al., 2009).

3.1.5 Therapie der Endometriose

Die Laparoskopie ist zur Diagnostik peritonealer Endometrioseherde erforderlich. Sie imponieren als oberflächliche Herde, die je nach Ausmaß der angiogenen Aktivität, Blutung und Fibrose eine rote, schwarze oder weiße Farbe aufweisen (Abb. 1). Solche Herde sollten primär videoassistiert reseziert werden. Diese Maßnahme führt zur Reduktion von Schmerzen (JACOBSON et al., 2009). Durch Suppression der ovariellen Funktion können sich darüber hinaus Endometrioseherde regressiv verändern. Die Induktion einer Amenorrhö kann endometriosebedingte Symptome reduzieren oder beseitigen. Dazu werden Gestagene, orale Antikonzeptiva oder Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)- Analoga eingesetzt (GUZICK et al., 2011). Bei ovariellen Endometriomen sollte die Zystenwand laparoskopisch reseziert werden. Weniger radikale Eingriffe führen zu deutlich häufigeren Rezidiven (ALBORZI et al., 2011). Die alleinige medikamentöse oder endokrine Therapie ist unzureichend. Die Therapie der Wahl bei der tief infiltrierenden Endometriose ist die potenziell kurative Resektion (CHOPIN et al., 2005; MEULEMAN et al., 2012). Eine organübergreifende Endometriose verlangt dabei meist ein interdisziplinäres Vorgehen. Der Uterus muss bei Kinderwunsch erhalten werden. Dies resultiert dann meist in einer inkompletten Resektion der Endometrioseherde.

Bei der Adenomyosis ist der Nutzen einer organerhaltenden Operation nicht belegt. Die Hysterektomie stellt die effektivste Therapie dar und ist bei abgeschlossener Familienplanung zu empfehlen (GARCIA und ISAACSON, 2011). Eine Alternativtherapie stellt die medikamentöse Induktion einer Amenorrhö durch Antikonzeptiva, Gestagene oder durch intrauterine Gestagen-freisetzende Systeme dar (VERCELLINI et al., 2003). Die medikamentöse Behandlung der Endometriose ist eine symptomatische Therapie. Sie hat das Ziel, eine Atrophie des hormonabhängigen Endometriums zu erreichen. Dazu muss der Östrogenspiegel gesenkt werden, um damit den Stimulus für das Endometrium zu reduzieren. Progestine, orale Kontrazeptiva und GnRH-Analoga sind Substanzen, die dazu in der Lage sind. Sie haben alle eine vergleichbare Effektivität aber verschiedene Nebenwirkungen und Nachteile. Die hauptsächlichen Nebenwirkungen der Progestintherapie sind Zwischenblutungen, Gewichtszunahme und Abnahme der Libido. Orale Kontrazeptiva werden generell gut vertragen, sind jedoch weniger effektiv in der Schmerzreduktion. GnRH-Agonisten sind sehr

effektiv, führen aber zu einer signifikanten Minderung der Knochendichte (MINJAREZ und SCHLAFF, 2000; GROSSMAN BAR, 2010).

3.1.6 Pathogenese der Endometriose

Obwohl die Endometriose eine seit Jahrhunderten bekannte Erkrankung ist, ist die Pathogenese dieser häufigen Erkrankung immer noch unklar. Sampsons Theorie der retrograden Menstruation ist aber nach wie vor die am häufigsten zitierte und am meisten akzeptierte Theorie der Genese der Endometriose. Sie postuliert, dass Endometriumgewebe während der Menstruation retrograd durch die Eileiter in den peritonealen Raum gelangt und sich auf dem Peritoneum und den Organen des kleinen Beckens implantiert (SAMPSON, 1927). Bei etwa 76 - 90 % der gesunden Frauen zeigt sich eine retrograde Menstruation, die sich im perimenstruellen Zeitraum laparoskopisch nachweisen lässt (Abb. 2). Es entwickeln jedoch deutlich weniger Frauen eine Endometriose (BLUMENKRANTZ et al., 1981; HALME et al., 1984; LIU und HITCHCOCK, 1986).

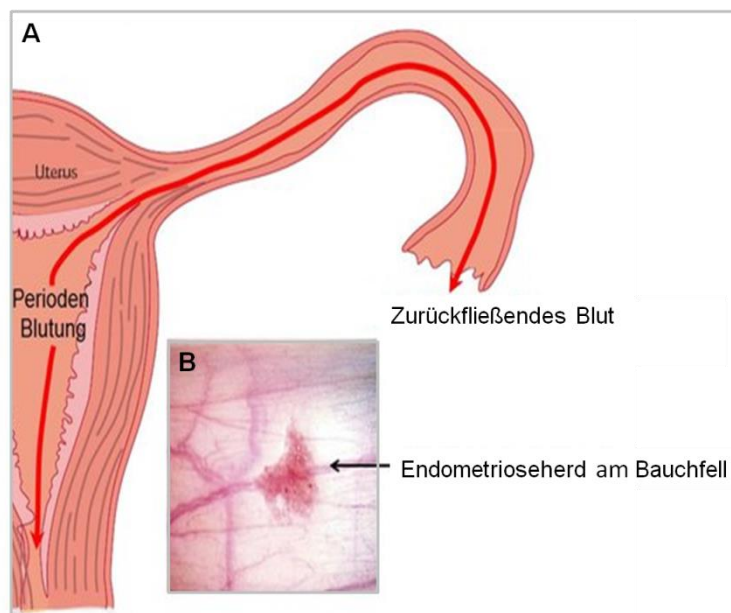


Abbildung 2: Schematische Darstellung der retrograden Menstruation nach Sampson (A) und Endometrioseherd am Peritoneum der Beckenwand (B) (entnommen aus www.frauenheilkunde.inselspital.bern.ch).

Trotz vieler Anhaltspunkte, die für die Theorie der Entstehung der Endometriose durch retrograde Menstruation sprechen, lassen sich Fälle einer Endometriose bei prämenarchen Mädchen, Neugeborenen und Männern unter Östrogenmedikation damit nicht erklären (OVERTON et al., 2007). Eine weitere Theorie der Entstehung der Endometriose ist die Zölom-Metaplasie-Theorie. Sie postuliert eine Metaplasie der Epithelien, die den Peritoneal- und Pleuraraum auskleiden sowie der Oberflächenepithelien des Ovars und des Müller-Gangs. Die metaplastischen Prozesse sollen durch Entzündung und hormonelle Einflüsse stimuliert werden (MEYER, 1919; FUJI, 1991; GIANNARINI et al., 2006). Eine dritte Theorie, die „embryonic rest theory“, geht davon aus, dass sich Endometrioseherde aus embryonalen Zellen, die vom Müller-Gang-System stammen, entwickeln (RUSSEL, 1899). Für die Entwicklung einer Endometriose in Lunge, Muskulatur, Haut oder Gehirn werden lymphatische und hämatogene „Metastasierung“ verantwortlich gemacht (JUBANYIK und COMITE, 1997). Die bisher genannten Theorien der Endometriose-Entstehung können nur potenzielle Mechanismen der Initiierung beschreiben. Sie können jedoch nicht erklären, warum nur ein Teil der Frauen erkrankt. Sie können auch nicht den Grund der unterschiedlichen Lokalisationen und die Arten der Manifestation der Erkrankung aufzeigen.

Als Bestätigung der Theorie von Sampson zeigt sich, dass Frauen mit einer Cervix uteri-Stenose und anderen angeborenen Ausflusstraktstenosen ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung einer Endometriose aufweisen (BARBIERI, 1998). Auch die experimentell induzierte Cervix-Stenose im Primatenmodell führt durch eine Verstärkung der retrograden Menstruation zu einer signifikant höheren Endometrioserate (D'HOOGHE et al., 1994). Darüber hinaus kann man, ebenfalls im Primatenmodell, durch intraperitoneale Injektion von menstruellem Endometrium in 75 % der Fälle eine peritoneale Endometriose erzeugen (D'HOOGHE et al., 1995).

Zusätzlich könnten pathologische Veränderungen im eutopen Endometrium, wie die Überproduktion von Prostaglandinen, Zytokinen, Chemokinen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie dysregulierte Proliferations- und apoptotische Zell-signalwege (BULUN, 2009; GUO, 2020) ausschlaggebend für die Entwicklung eines Endometrioseherdes sein.

Endometriales Gewebe, das durch retrograde Menstruation in den peritonealen Raum gelangt, wird schon früh durch das Immunsystem eliminiert. Ein gestörtes Im-

munsystem mit defekten natürlichen Killerzellen und einer reduzierten T-Zell-Zytotoxizität kann zu einer verminderten Clearance von ektopem, endometrialem Gewebe innerhalb der Peritonealhöhle führen (KYAMA et al., 2003). Eine Dysfunktion des Immunsystems könnte erklären, warum die endometrialen Gewebeverbände adhären und überleben können (GIUDICE und KAO, 2004). Eutopes Endometrium von Frauen mit Endometriose erwies sich als resistenter gegenüber einer Lyse durch natürliche Killerzellen als Endometrium von gesunden Frauen (OOSTERLYNCK et al., 1992). Darüber hinaus scheint bei Endometriose-Patientinnen eine Dysfunktion der Makrophagen vorzuliegen (SHARPEH-TIMMS et al., 2002). Außerdem enthält die peritoneale Flüssigkeit von Frauen mit Endometriose eine größere Anzahl von Makrophagen als die peritoneale Flüssigkeit gesunder Frauen (WU et al., 2002). Dabei ist das Verhältnis zwischen M1-(klassische Aktivierung) und M2-Polarisation (alternative Aktivierung) der Makrophagen zugunsten der M2-Polarisation verschoben, was eine verbesserte Implantation des ektopen Endometriums erklären kann (WANG et al., 2015). Wenn die Endometriumzellen im Bereich des Peritoneums adhären, folgen zur Entstehung einer Endometriose als nächste Schritte Invasion und Wachstum, wobei hieran hauptsächlich die glandulären Epithelien beteiligt sind. Im Endometrium von Frauen mit Endometriose wurde eine erhöhte proteolytische Aktivität nachgewiesen, die dies begünstigt. Eine anomale Expression des Plasminogenaktivatorsystems und verschiedener MMPs könnten dafür verantwortlich sein (GILBERT-ESTELLES et al., 2003). Die Rolle von Entzündungsmediatoren bei der Entstehung der Endometriose und die Möglichkeit, über die Beeinflussung dieser Mediatoren eine Therapie der Endometriose zu implementieren, wurde bisher intensiv untersucht. In Tiermodellen ließ sich durch die Inhibition von tumor necrosis factor- α (TNF- α), macrophage migration inhibitory factor (MIF) oder Prostaglandin E₂ (PGE₂) jeweils eine signifikante Regression von Endometrioseherden erreichen (FALCONER et al., 2006; LASCHKE et al., 2007; NOTHNICK et al., 2011). Eine Umsetzung in die Therapie der humanen Endometriose ist jedoch bisher nicht erfolgt. Tierversuche legen nahe, dass der Östrogenrezeptor- β -Signalweg viele der Zytokinwirkungen vermittelt, die das Wachstum der Endometrioseherde positiv beeinflussen, sodass der Rezeptor selbst ein Ziel in der Behandlung der Endometriose sein könnte (NOTHNICK und ALALI, 2016).

Zum Wachstum der Endometrioseherde sind jedoch auch Angiogenese und Vasculogenese erforderlich. Die Angiogenese wird in erster Linie durch den vascular en-

dothelial growth factor (VEGF) stimuliert, wobei es Hinweise gibt, dass die VEGF-Konzentration sowohl im Serum als auch in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen gegenüber Frauen ohne Endometriose erhöht ist (BOURLEV et al., 2006). Darüber hinaus wird bei Patientinnen mit Endometriose eine verminderte Konzentration anti-angiogener Faktoren in der Peritonealflüssigkeit beschrieben (LASCHKE und MENGER, 2007). Neuere Studien weisen darauf hin, dass endometriale, insbesondere aber vom Knochenmark stammende Stamm- und Progenitorzellen durch Vaskulogenese an der Entstehung der Endometriose beteiligt sind (LASCHKE und MENGER, 2007; MASUDA et al., 2007; SASSON und TAYLOR, 2008). Auch das eutope Endometrium von Endometriose-Patientinnen zeigt im Vergleich zu dem Endometrium gesunder Frauen ein höheres angiogenes Potential (HUR et al., 2006). Generell gilt, dass die oberflächliche Implantation von endometrialem Gewebe in das Peritoneum durch Faktoren in der Peritonealflüssigkeit reguliert wird, während die tief infiltrierende Endometriose und die zystische ovarielle Endometriose durch Faktoren aus dem Blut oder dem Ovar beeinflusst werden (KONINCKX et al., 1998).

Möglicherweise ist aber auch die Gewebeintegrität des ektopen Endometriums entscheidend für die Etablierung von Endometrioseherden (NAP et al., 2003). Tatsächlich deuten experimentelle Studien darauf hin, dass eine intakte Architektur frisch isolierter Endometriumfragmente mit Stromagewebe und endometrialen Drüsen eine entscheidende Voraussetzung für die Bildung von Endometrioseherden ist (GRÜMMER et al., 2001; NAP et al., 2003). Ausgehend von der Theorie von Sampson benötigt ein Endometriumfragment für die Passage durch die Tuben bis zum Anwachsen an das Peritoneum einige Stunden bis Tage. Während dieser Zeit ist das Endometriumfragment avaskulär und somit einer Hypoxie ausgesetzt. Bisher ist noch unklar, inwieweit dies die Viabilität, Proliferation, Inflammation und Angiogenese des Gewebes und schließlich dessen Fähigkeit, sich zu einem ektopen Endometrioseherd zu entwickeln, beeinflusst. Entsprechend wurde dieser Fragestellung in der vorliegenden Arbeit in tierexperimentellen Endometriosemodellen nachgegangen.

4 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, wie eine durch Präkultivierung verursachte Hypoxie die Gewebearchitektur von Uterusfragmenten verändert und somit Einfluss auf deren Überleben, Proliferation, Angiogenese, Entzündungsaktivität und Fähigkeit zur Entwicklung von Endometrioseherden nimmt.

Hierbei sollten die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Unterscheiden sich frisch isolierte von 24h- und 72h-präkultivierten Uterusfragmenten bezüglich ihrer Morphologie, Zell- und Mikrogefäßdichte, Apoptoserate und Expression Angiogenese-relevanter Proteine?
2. Wie wirkt sich die Präkultivierung von Uterusfragmenten auf deren Anwachsrate, Morphologie, Mikrogefäßdichte, Apoptose, Proliferation und Entzündungszellinfiltration im Maus-Modell der intraperitonealen Endometriose aus?
3. Welche Unterschiede in der Vaskularisierung bestehen zwischen frisch isolierten gegenüber 24h- und 72h-präkultivierten Endometriumfragmenten im Maus-Modell der Rückenhautkammer?

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden gemäß dem Tierschutzgesetz durchgeführt und durch das Landesamt für Gesundheit, Soziales und Verbraucherschutz (Saarbrücken) genehmigt (Zulassungsnummern: 21/2010; 53/2011).

Sowohl im Modell der Rückenhautkammer als auch im intraperitonealen Endometriosemodell wurden als Versuchstiere weibliche C57BL/6 Mäuse als Empfängertiere und C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Mäuse als Spendertiere aus eigener Zucht verwendet.

Das Körpergewicht der Mäuse betrug 22-25 g. In klimatisierter Umgebung erfolgte die Haltung der Tiere in einem 12h/12h-Tag/Nachtrhythmus. Der Allgemeinzustand der Tiere sowie Fress-, Trink- und Schlafverhalten wurden während des gesamten Zeitraums der Experimente überwacht. Die Tiere hatten zu jeder Zeit Zugang zu Trinkwasser und Standardpelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland).

5.2 Bestimmung des Zyklusstadiums

Da Endometrioseherde ein östrogenabhängiges Wachstum zeigen (LASCHKE et al., 2005), wurden zum Ausschluss des Einflusses hormoneller Schwankungen auf die Experimente nur Mäuse als Empfänger und Spender verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme von Uterus- oder Endometriumfragmenten und zum Transplantationszeitpunkt im Stadium des Östrus befanden. Die Zyklusbestimmung erfolgte mittels Vaginalzytologie. Hierbei wurden mit einer Pipette 15 µl Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) intravaginal appliziert und nach Durchmischung mit dem vaginalen Zellmaterial auf einen Objektträger aufgetragen. Das Zyklusstadium wurde mikroskopisch (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Bei der Maus lassen sich vier Zyklusstadien unterscheiden: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus (BYERS et al., 2012). Man kann diese mikroskopisch anhand der für jedes Stadium charakteristischen Zellpopulationen unterscheiden (Abb. 3). Im Proöstrus dominieren Intermediär- und Superficialzellen (Abb. 3A). In der

Anfangsphase des Proöstrus zeigen sich vereinzelt Leukozyten, während in der Spätphase auch Superficialzellen vorkommen können. Im Stadium des Östrus zeigen sich vor allem keratinisierte Epithelzellen (Abb. 3B). Auf das Stadium des Östrus folgt der Metöstrus, der ein gemischtes Zellbild aufweist (Abb. 3C). Man findet Intermediärzellen, keratinisierte Epithelzellen und Leukozyten. Während des Diöstrus dominieren Leukozyten (Abb. 3D).

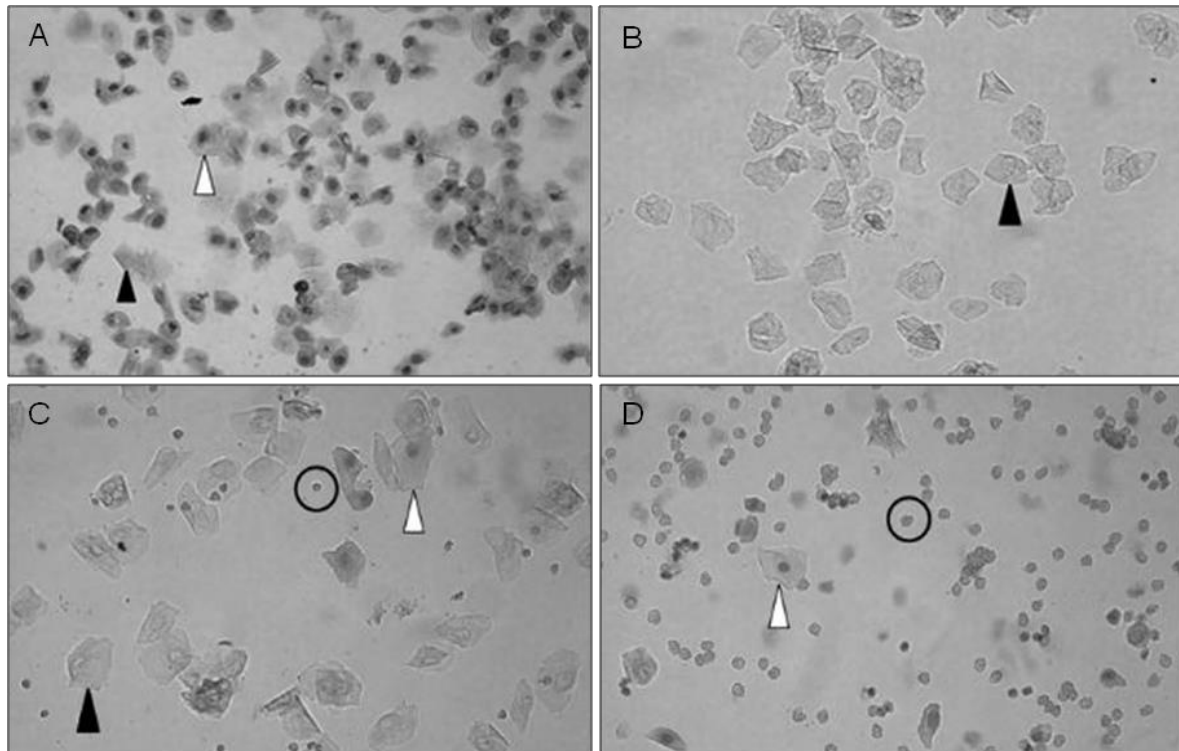


Abbildung 3: Vaginalzytologie mit den vier Zyklusstadien der Maus. Drei Zelltypen sind markiert: Leukozyten (Kreis), keratinisierte Epithelzellen (schwarze Pfeilspitze) und Intermediärzellen (weiße Pfeilspitze). **A:** Proöstrus, **B:** Östrus, **C:** Metöstrus, **D:** Diöstrus (BYERS et al., 2012).

5.3 Gewinnung von Uterusgewebe

Als Spendertiere zur Isolierung von Uterusfragmenten für das intraperitoneale Endometriosemodell und von Endometriumfragmenten für das Modell der Rückenhautkammer wurden transgene C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Mäuse verwendet. Diese Mauslinie ist mit einer cDNA transfiziert, welche das enhanced green fluorescent protein (eGFP) kodiert. Die cDNA wird über einen Huhn- β -Aktin-Promoter und einen Cytomegalie-Enhancer gesteuert. Bei diesen Mäusen leuchtet das Gewe-

be mit Ausnahme von Blutzellen und Haaren unter fluoreszierendem Licht grün (OKABE et al., 1997).

Zur Gewinnung von Uterusgewebe wurden die Spendermäuse mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht (KG); Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Nach Fixierung in Rückenlage und Desinfektion des Bauches (Softasept N; B. Braun Melsungen AG) erfolgte eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba. Beide Uterushörner wurden reseziert und in einer Petrischale platziert (Abb. 4A). Diese enthielt 37°C-warmes Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 10 % fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland). Nach Längseröffnung beider Uterushörner mittels Mikroschere und Fixierung der Uterushörner auf einer Korkunterlage unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) erfolgte die Gewinnung von Uterusproben (Abb. 4B). Diese unterschieden sich in den beiden verwendeten Versuchsmodellen. Für das Modell der intraperitonealen Endometriose wurden unter Zuhilfenahme einer Biopsiestanze mit 2 mm Durchmesser (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) ganze Uterusfragmente gewonnen.

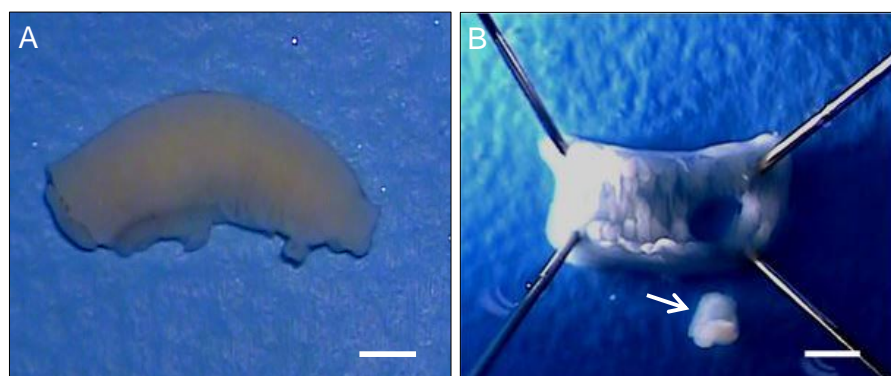


Abbildung 4: Entnahme von Uterusfragmenten. **A:** Reseziertes Uterushorn in DMEM. **B:** Längs eröffnetes Uterushorn mit 2 mm Gewebestanz (weißer Pfeil). Maßstab: 1,5 mm.

Zur Isolierung von Endometriumgewebe für die Transplantation in die Rückenhautkammer wurde beim längs eröffneten Uterushorn zunächst das Myometrium mittels Mikroschere abpräpariert. Das Endometrium wurde dann in 1mm große Fragmente

geschnitten. Die gewonnenen Endometriumfragmente wurden in eine Petrischale transferiert, die mit 37°C-warmen DMEM befüllt war.

5.4 Präkultivierung des Uterusgewebes

Die Gewinnung der Uterus- bzw. Endometriumfragmente erfolgte jeweils 0h (frisch isoliert), 24h und 72h vor Transplantation. Um eine Aggregation der Fragmente zu verhindern, wurde je 1 Fragment in ein Well einer 24-Wellplatte umgesetzt und anschliessend in DMEM jeweils 24h bzw. 72h bei 37°C im Brutschrank unter atmosphärischen Normalbedingungen bei 5 % CO₂ inkubiert. Die Gewebefragmente der 0h-Gruppe wurden direkt am Tag der Transplantation gewonnen, was ein Umsetzen in eine Wellplatte nicht erforderlich machte.

Fünfzehn durch Biopsie gewonnene Uterusfragmente (jeweils 5 Fragmente der 0h-, 24h- und 72h-Gruppe) wurden unmittelbar nach der Präkultivierung für weitere Untersuchungen über 24h in 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Zusätzlich wurden weitere 24 Fragmente jeder Gruppe in Lyse-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,1 mM Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 % Triton-X 100; 0,02 % NaN₃; 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 1:75 v/v Proteaseinhibitor-Cocktail; 1:100 v/v Phosphatinhibitor-Cocktail) (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland) zur Detektion Angiogenese-assoziierter Proteine mittels Protein-Array asserviert.

5.5 Induktion intraperitonealer Endometrioseherde

Im Modell der intraperitonealen Endometriose werden Endometrioseherde durch Transplantation von Uterusfragmenten auf das Peritoneum induziert. Der Vorteil der Transplantation auf das Peritoneum besteht darin, dass das Wachstum der einzelnen fixierten Uterusfragmente zu annähernd beliebigen Zeitpunkten mittels hochauflösender Ultraschallmessung kontrolliert werden kann. Als Empfängertiere wurden weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Diese wurden vor der Transplantation durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Nach Fixierung in Rückenlage wurde die Bauchdecke zunächst rasiert und anschließend mit Enthaarungscreme

(Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp; Mississauga, ON, Kanada) depiliert. Danach wurde die Bauchdecke mit feuchten Kompressen gereinigt. Zum Augenschutz unter Narkose wurde Augensalbe (Bepanthen, Augen- und Nasensalbe; Bayer) auf Cornea und Sklera aufgebracht. Nach Desinfektion mit Softasept N (B. Braun Melsungen AG) erfolgte eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba. Auf jeder Seite der lateralen Bauchwand wurde jeweils ein Uterusfragment jeder Gruppe am Peritoneum mit einem 6-0 Prolene-Faden (Ethicon Produkte, Norderstedt, Deutschland) fixiert (Abb. 5). Die Anordnung der Uterusfragmente wurde von Tier zur Tier gewechselt, um einen möglichen Einfluss der Lokalisation auf das Wachstum der Herde auszuschließen.

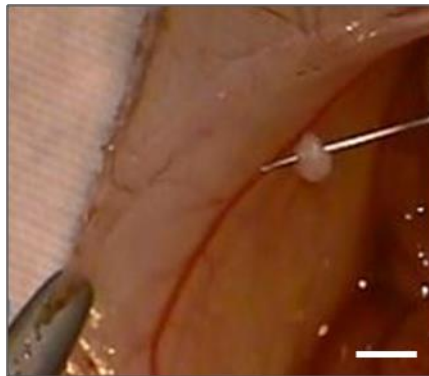


Abbildung 5: Fixierung eines Uterusfragments am Peritoneum der lateralen Bauchwand. Maßstab: 3 mm.

Im Anschluss wurde die Muskelfaszie mit fortlaufender 6-0 Prolene-Naht (Ethicon Produkte) verschlossen. Die Hautnaht erfolgte durch eine fortlaufende 5-0 Prolene Naht (Ethicon Produkte). In der Aufwachphase wurden die Tiere unter einer Wärmelampe platziert und danach in Käfigen mit 2 - 5 Tieren gehalten.

5.6 Größenentwicklung der Endometrioseherde

5.6.1 Hochauflösende Ultraschallmessung

Die Ultraschallanalyse (Vevo 770; VisualSonics, Toronto, Kanada) der intraperitonealen Uterusfragmente wurde am Tag der Transplantation (Tag 0) sowie am 7., 14., 21. und 28. Tag durchgeführt. Für die Ultraschallanalyse wurden die Mäuse mit 4 Vol %

Isofluran (Baxter Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland) in 100 % Sauerstoff narkotisiert (Abb. 6A und B). Nach Fixierung in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch wurde den Mäusen zur Aufrechterhaltung der Narkose kontinuierlich 2 Vol % Isofluran (Baxter Deutschland GmbH) über eine Atemmaske zugeführt.

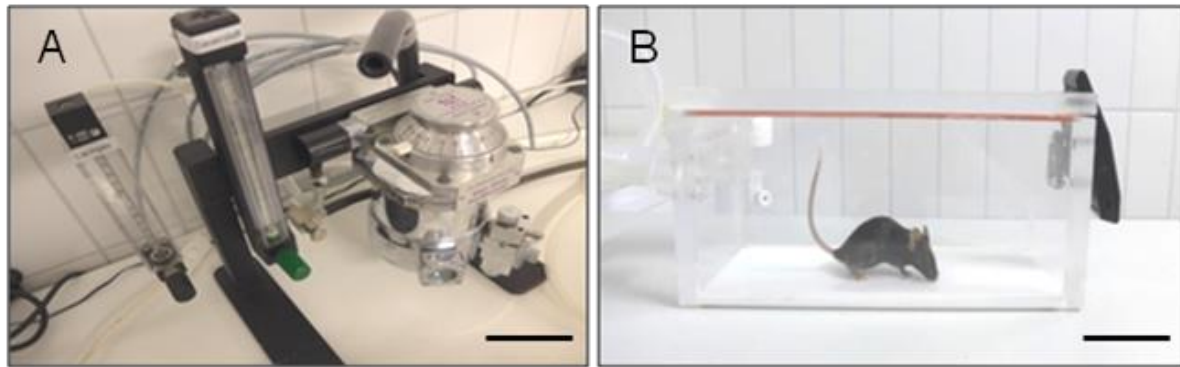


Abbildung 6: Narkose einer Maus während der Ultraschallmessung. **A:** Narkosegerät zur Isofluran-narkose (Parkland Scientific, Coral Springs, FL, USA). Maßstab: 8 cm. **B:** Einleitungsbox aus Plexiglas. Maßstab: 5 cm.

Während der Untersuchung wurden Herz- und Atemfrequenz mit Hilfe von Tischelektroden überwacht (THM 100; Indus Instruments, Houston, Texas, USA). Die Bauchdecke wurde depiliert und das Ultraschallgel (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) aufgetragen. Die Ultraschalluntersuchung erfolgte mit einem 704 real-time microvisualization (RMW) Schallkopf (VisualSonics) mit einer Frequenz von 40 MHz und einer Fokustiefe von 6 mm (Abb. 7A). In einem einheitlichen Schnittabstand von 50 μm wurden mit Hilfe eines linearen Motors zweidimensionale Schnittbilder über die gesamte Länge des sich entwickelnden Endometrioseherdes generiert. Im Anschluss wurden aus dem gewonnenen Bildmaterial mit Hilfe einer speziellen Software (Vevo 770 V2.3.0, VisualSonics) dreidimensionale Bilder rekonstruiert (Abb. 7B). So konnten mit Hilfe der Software durch Bestimmung der Herdgrenzen und der Grenzen der zystisch dilatierten Drüsen (im Folgenden als Zysten bezeichnet) das Gesamtvolumen der sich entwickelnden Endometrioseherde sowie Stroma- und Zystenvolumina (jeweils in mm^3) bestimmt werden.

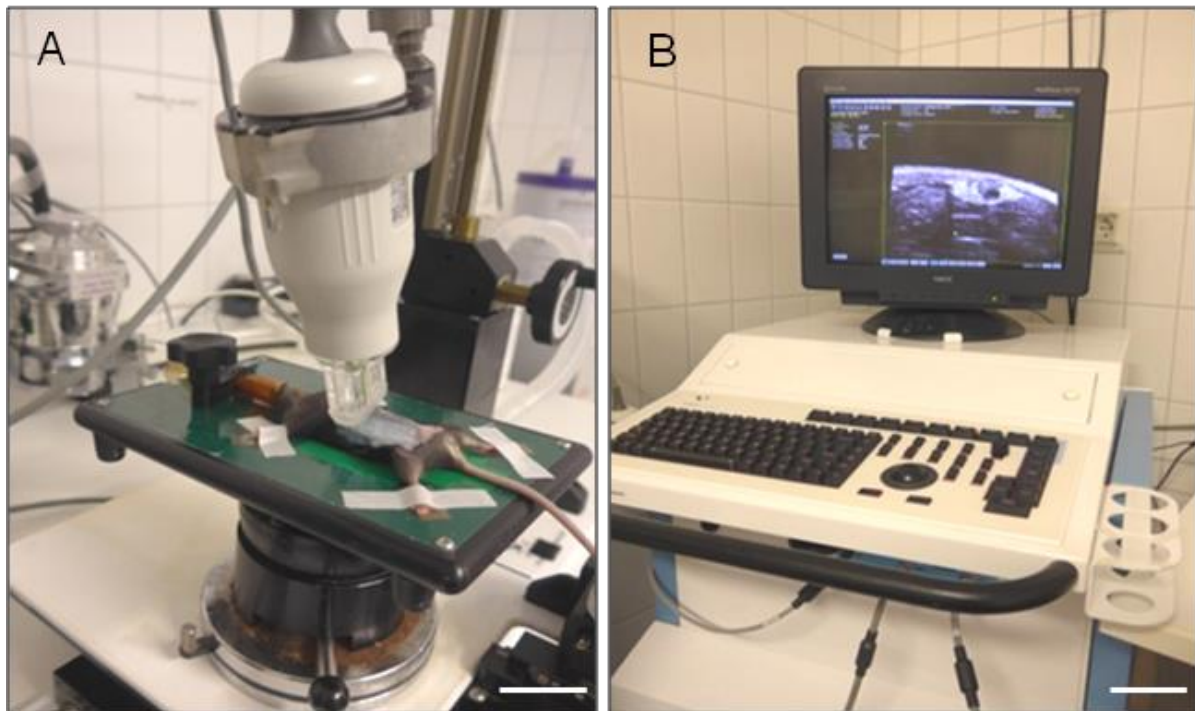


Abbildung 7: Ultraschalluntersuchung der Maus. **A:** Ultraschalltisch mit 40 MHz Schallkopf und fixierter Maus. Maßstab: 5 cm. **B:** Ultraschallgerät mit Konsole und Bildschirm. Maßstab: 11 cm.

5.6.2 Größenmessung der Endometrioseherde mittels digitalen Messschiebers

Im Anschluss an die letzte Ultraschalluntersuchung an Tag 28 wurden die Versuchstiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer) erneut narkotisiert. Nach medianer Laparotomie erfolgte die Messung der intraperitonealen Endometrioseherde mittels digitalen Messschiebers (0 - 150 mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland) unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH). Hierbei wurden der größte Längsdurchmesser (d1) und der dazu senkrechte Querdurchmesser (d2) vermessen. Mit Hilfe der Formel $d1 \times d2 \times \pi / 4$ (BECKER et al., 2008) konnte so die Größe des Herdes (mm²) berechnet werden. Nach Vermessung aller 6 Endometrioseherde wurde das Versuchstier mit einer Überdosis Pentobarbital (200 mg/kg KG intraperitoneal) (Narcoren; Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) eingeschläfert. Die Endometrioseherde wurden für weitere Untersuchungen exzidiert und in 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert (Abb. 8A und B).

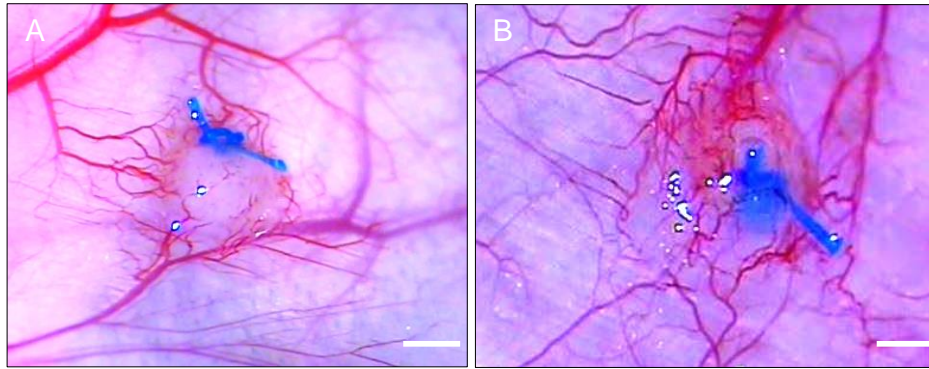


Abbildung 8: Intraperitoneale Endometrioseherde in situ nach 28 Tagen. **A:** Endometrioseherd nach Transplantation eines frisch isolierten Uterusfragments fixiert mit einem Prolene Faden. **B:** Endometrioseherd nach Transplantation eines 24h-präkultivierten Uterusfragments ebenfalls fixiert mit einem Prolene Faden. Maßstab: 1 mm.

5.7 Das Modell der Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer ist ein etabliertes Modell zur nicht-invasiven in vivo Analyse mikrozirkulatorischer Parameter über einen Zeitraum von 2 - 3 Wochen mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie (LEHR et al., 1993). Sie kann auf den Rücken von Mäusen (CARDON et al., 1970), Hamstern (ENDRICH et al., 1982) und Ratten (PAPPENFUSS et al., 1979) implantiert werden. Das Modell wurde detailliert von MENGER et al. (2002) beschrieben und von LASCHKE et al. (2005) erstmals für die Untersuchung von Endometrioseherden eingesetzt.

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titanrahmen mit einem Beobachtungsfenster (Abb. 9A). Nach retrobulbärer Injektion von Fluoreszenzfarbstoff ist es möglich, mittels Fluoreszenz-Auflichtmikroskopie die Mikrozirkulation der Rückenhautkammer sowie die Entwicklung neuer Gefäße darin befindlicher Transplantate zu analysieren.

5.7.1 Präparation der Rückenhautkammer

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurden weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Diese wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Zum Augenschutz unter Narkose wurde Augensalbe (Bepanthen, Augen- und Nasensalbe; Bayer) auf Cornea und Sklera aufgebracht. Der Rücken der Tiere wurde zunächst

rasiert und chemisch depiliert (ASID-med Enthaarungscreme; ASID Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland). Rückstände der Creme wurden mit lauwarmem Wasser sorgfältig abgespült. Die Tiere wurden quer zum Operateur in Bauchlage gelagert und das OP-Feld mit Softasept (B. Braun Melsungen AG) desinfiziert.

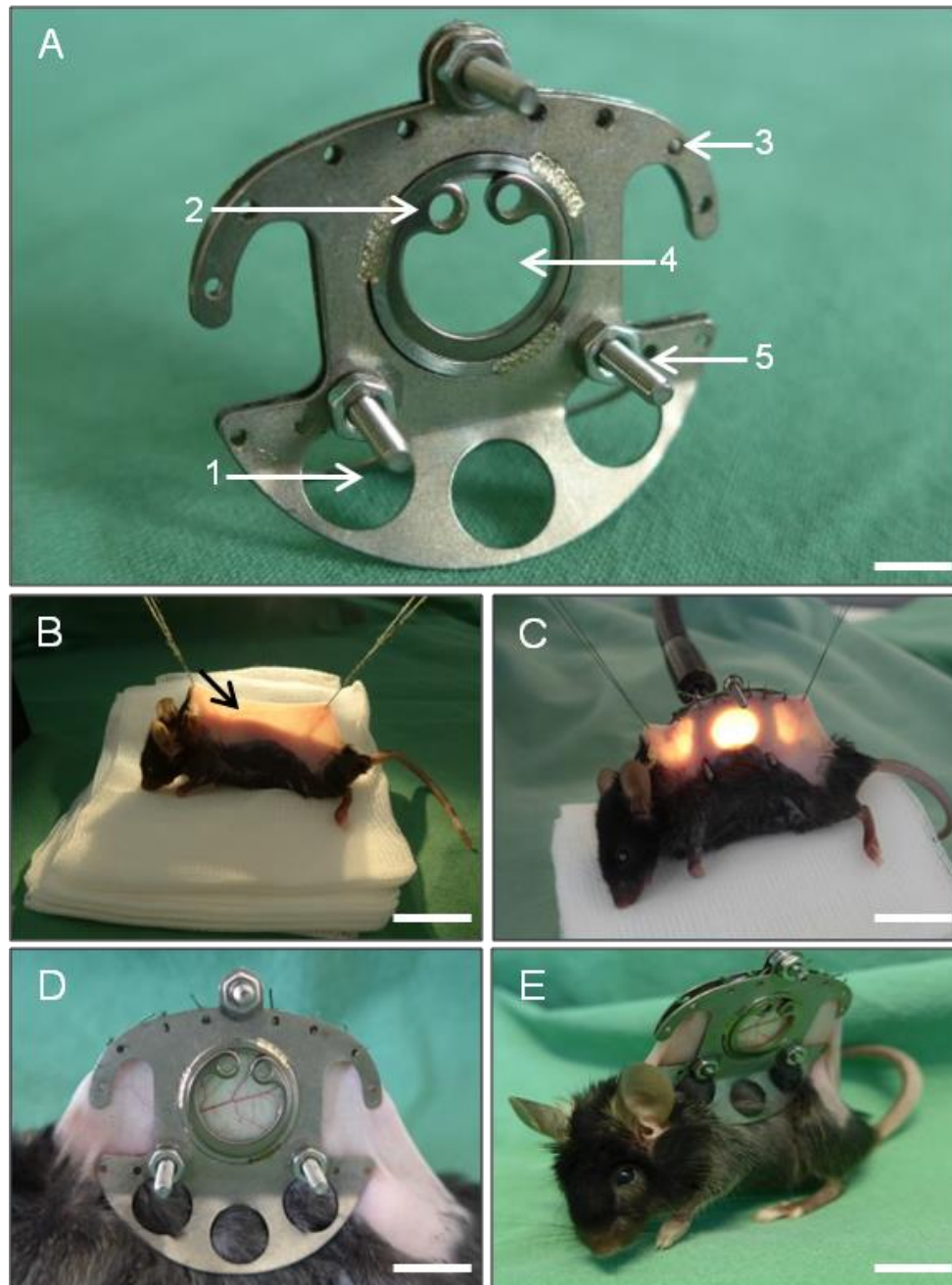


Abbildung 9: Präparation der Rückenhautkammer. **A:** Rückenhautkammer für die Maus, bestehend aus zwei Titanrahmen mit zentralem Beobachtungsfenster (Gewicht: 2,2 g). 1: Materialaussparung zur Gewichtstreduktion; 2: Sprengring zur Fixierung des Deckglases; 3: Bohrung für Fixationsfäden; 4: Beobachtungsfenster, verschlossen mit Deckglas und Sprengring zur Fixation; 5: Verbindungsschraube mit Schraubenmutter. Maßstab: 7,5 mm. **B:** Identifizierung der Gefäße (schwarzer Pfeil) in Transillumination. Maßstab: 10 mm. **C:** Anbringung des hinteren Rahmens der Rückenhautkammer. Maßstab: 15 mm. **D:** Fixierung des vorderen Titanrahmens am hinteren Rahmen der Rückenhautkammer mittels Verbindungsschrauben. Maßstab: 10 mm. **E:** Rückenhautkammer in situ. Maßstab: 15 mm.

Die Rückenhaut wurde in der Mittellinie angehoben. In Transillumination wurden die beiderseitigen Hauptgefäße der Rückenhaut identifiziert und die Hautfalte so verschoben, dass die Gefäße der rechten und der linken Seite zur Deckung kamen. Danach wurde diese Position durch zwei Haltenähte fixiert. Die Haltefäden wurden an einer längs über das Tier verlaufenden Stange befestigt und unter Zug gebracht (Abb. 9B). Der hintere Rahmen der Rückenhautkammer (Abb. 9A) wurde an den vorgesehenen oberen Bohrungen an der Oberkante der Hautfalte fixiert. An den für die Verbindungsschrauben der beiden Rahmen vorgesehenen Stellen wurde die Hautfalte basisnah inzidiert und die Verbindungsschrauben positioniert (Abb. 9C). Unter Transillumination konnte der Umriss des späteren Beobachtungsfensters eingezeichnet werden. Danach wurden die Haltefäden entfernt und das Tier in Rechtsseitenlage unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) gelagert. Im Bereich des späteren Beobachtungsfensters wurden Haut, Subcutis, M. panniculus carnosus und M. retractor auf der dem Operateur zugewandten Seite und der M. retractor der Gegenseite mittels Mikroschere vorsichtig abpräpariert. Die Größe des präparierten Areals musste dabei die Größe des späteren Beobachtungsfensters überschreiten, um eine Gewebekompression zu vermeiden. Um eine Austrocknung während der Präparation zu verhindern, wurde das Operationsgebiet wiederholt mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült. Schließlich wurde der vordere Kammerrahmen mittels der Verbindungsschrauben fixiert (Abb. 9A). Ein Deckglas wurde in den vorderen Kammerrahmen eingelegt (Abb. 9D und E). Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich weder Flüssigkeitsansammlungen noch Lufteinschlüsse unter dem Deckglas befanden. Schließlich erfolgte die Fixation des Deckglases mit einem Sprengring (Abb. 9A). Die Verbindungsschrauben wurden anschließend gekürzt. Während der Aufwachphase wurden die Versuchstiere unter einer Wärmelampe platziert und im weiteren Versuchszeitraum in Einzelkäfigen gehalten.

5.7.2 Transplantation der Endometriumfragmente

Es wurden 48h zur Erholung des Gewebes abgewartet bis die Transplantation der Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer erfolgte. Hierzu wurden die Versuchstiere erneut mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Sprengring sowie Deckglas der Rückenhautkammer wurden entfernt und die Kammer mit

physiologischer Kochsalzlösung gespült. In jede Rückenhautkammer wurden 3 Endometriumfragmente (jeweils 0h, 24h und 72h präkultiviert) so transplantiert, dass ein größtmöglicher Abstand zwischen ihnen lag. Die Positionierung erfolgte randomisiert, um einen möglichen Einfluss der Lage der Transplantate auf ihre Vaskularisierung und ihr Wachstum auszuschließen. Ein neues Deckglas wurde auf die Rückenhautkammer aufgebracht. Lufteinschlüsse und Flüssigkeitsansammlungen unter dem Deckglas wurden entfernt. Zur Fixierung des Deckglases wurde wieder ein Sprengring eingesetzt. Postoperativ wurden die Mäuse bis zum Erwachen aus der Narkose unter einer Wärmelampe platziert.

5.8 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Vor jeder intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer) in Narkose versetzt. In Rechtsseitenlage wurden die Mäuse auf einer Plexiglasbühne über die Verbindungsschrauben der beiden Kammerhälften fixiert. Zur Darstellung der Mikrozirkulation wurde als Plasamarker Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-gefärbtes Dextran 150.000 (Sigma-Aldrich) in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Durch das hohe Molekulargewicht verbleibt der Farbstoff intravaskulär, was eine gut kontrastierte Darstellung der Gefäße erlaubt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Zeiss Axio-Tech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit 5x, 10x und 20x Objektiven (Zeiss) mit langem Arbeitsabstand ausgestattet war. Für die Auflichttechnik wurde eine 100 Watt Quecksilberdampfampe (HBO, Osram, München, Deutschland) benutzt. Drei Filterblöcke (grün, blau und ultraviolett) erlaubten eine Anregung des Lichts mit einer Wellenlänge von 530-560 nm, 450-490 nm bzw. 330-390 nm. Die Mikrogefäße wurden im Blaulichtfilter dargestellt. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer CCD-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet und auf einen Bildschirm (KV-14 CT1E; Sony, Tokyo, Japan) transferiert. Die Speicherung des Bildmaterials erfolgte auf DVD. Die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der Endometriumfragmente durchgeführt. An Tag 14 wurden die Rückenhautkammern der Versuchstiere nach abgeschlossener intravitalmikroskopischer Unter-

suchung entfernt. Dabei wurden die neu entwickelten Endometrioseherde exziiert und für weitere Untersuchungen in 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Die Versuchstiere wurden mit einer Überdosis Pentobarbital (200 mg/kg KG intraperitoneal; Narcoren; Merial GmbH) eingeschläfert.

5.8.1 Funktionelle Kapillardichte und Flächenmessung

Die Auswertung der auf DVD gespeicherten Bilder erfolgte mit Hilfe eines computer-gestützten Bildanalyse-systems (CapImage, Version 8.5; Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Dabei wurde die funktionelle Kapillardichte erfasst. Zur Messung der funktionellen Kapillardichte (in cm/cm²) wurde mit dem 10x Objektiv die Gesamtstrecke aller perfundierten Mikrogefäße innerhalb eines Endometrioseherdes gemessen und in Relation zur Herdfläche gesetzt. Zur Bestimmung der Herdfläche wurde eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Darin konnten die Grenzen des Herdes eingezeichnet werden und somit innerhalb des markierten Bereichs die Fläche (in mm²) gemessen werden. In gleicher Weise erfolgte die Messung des neu vaskularisierten Areal (in mm²) innerhalb eines Herdes. Dieses war definiert als die Fläche des Herdes, welche zum Zeitpunkt der Analyse bereits durchblutete Mikrogefäße aufwies.

5.9 Histologie und Immunhistochemie

Frisch entnommene und präkultivierte Uterusfragmente sowie intraperitoneale Endometrioseherde und Herde aus der Rückenhautkammer wurden am jeweiligen Ende des Untersuchungszeitraums entnommen und für 24h in 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden mittels Mikrotom (Cut 5062; SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) 3 µm-dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden weiter prozessiert und mit verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Techniken untersucht.

5.9.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist die Standardmethode für morphologische Studien. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der die sauren Strukturen der Zelle, wie z.B. DNA, blau anfärbt und damit als Kernfarbstoff Verwendung findet. Eosin ist ein synthetischer

Farbstoff, der die basischen Strukturen der Zelle (Zytoplasmaproteine, Mitochondrien) rot färbt (SPECTOR und GOLDMAN, 2006). Von jedem Gewebefragment bzw. Endometrioseherd wurden Serienschnitte angefertigt, wobei jeder sechste Schnitt nach einem Standardprotokoll mit HE gefärbt wurde. Anhand der Serienschnitte wurden die Schnitte für weitere Analysen ausgesucht. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (BX-60, Olympus). Hierbei wurden die Gewebefragmente der einzelnen Gruppen identifiziert, die sich zu einem Endometrioseherd mit typischer Morphologie (ausgebildete Drüsenschläuche, intaktes Stroma) entwickelt hatten. Diese wurden ins Verhältnis zu der Gesamtzahl der transplantierten Fragmente der jeweiligen Gruppe gesetzt. So konnte die Anwachsrate (in %) innerhalb der einzelnen Gruppen ermittelt werden.

5.9.2 Ki67-Färbung

Ki67 ist ein Proliferationsmarker, der während der Mitose nachweisbar wird (SCHOLZEN und GERDES, 2000). Als primärer Antikörper zur Detektion Ki67-positiver Zellen wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-Ki67 Antikörper (1:500 Abcam, Cambridge, UK) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (ready-to-use, Abcam) verwendet. Danach wurde Avidin-Peroxidase (POD) (ready-to-use, Abcam) hinzugegeben. Diaminobenzidin (DAB) diente als Chromogen, das durch die Peroxidase im Avidin-Biotin-Komplex zu einer Farbreaktion führte. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (BX-60, Olympus). Für jeden Endometrioseherd wurde ein repräsentativer Schnitt ausgewählt. Es wurde in jeweils vier Bereichen der Anteil Ki67-positiver Zellen von allen sichtbaren Zellen erfasst und die Proliferationsrate in % angegeben. Bei der Auszählung wurde zwischen Stroma- und Drüsenzellen unterschieden.

5.9.3 Cleaved Caspase-3 (Casp-3)-Färbung

Casp-3 wird bei Apoptose aktiviert und ist eine Effektorcaspase, die die Fragmentierung der DNA vermittelt (PORTER und JÄNICKE, 1999). Casp-3-exprimierende apoptotische Zellen wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Casp-3-Antikörper (1:100; New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) detektiert. Sekundärantikörper war ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (ready-to-

use, Abcam). DAB diente als Chromogen, das durch die Peroxidase im Avidin-Biotin-Komplex zu einer Farbreaktion führte. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (BX-60, Olympus). Durch Auszählen des Anteils Casp-3-positiver Zellen von allen sichtbaren Zellen in vier Bereichen eines repräsentativen Schnitts pro Herd konnte die Apoptoserate (in %) bestimmt werden.

5.9.4 CD31-Färbung

CD31 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1) ist ein Oberflächenmolekül, welches in erster Linie von Endothelzellen exprimiert wird und an der Angiogenese beteiligt ist. Der Nachweis CD31-positiver Gefäße dient zur Erfassung der Gefäßdichte im Gewebe. Primärantikörper war ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31 Antikörper (1:100; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland), Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Ratte-Alexa-Indocarbocyanin-Antikörper (1:200; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Für alle immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) gefärbt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem BZ-8000 Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan). Zur Berechnung der Gefäßdichte (in mm⁻²) wurde die Gesamtzahl der CD31-positiven Mikrogefäße innerhalb der Uterus- und Endometriumfragmente bzw. der Endometrioseherde gezählt und durch die analysierte Gewebefläche geteilt.

5.9.5 CD31/GFP-Doppelfärbung

GFP-positive Mikrogefäße in den sich neu entwickelnden Endometrioseherden gaben Anhalt, dass sie von den transplantierten Uterusfragmenten stammen und nicht aus dem Empfängergewebe eingewachsen waren. Die Schnitte wurden zunächst mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus-Antikörper gegen CD31 (1:30; Dianova GmbH) inkubiert, um die endothelialen Zellen zu detektieren. Um die GFP-Fluoreszenz zu verstärken, kam ein Ziege-anti-GFP-Antikörper (1:200; Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Als sekundäre Antikörper wurden ein Ziege-anti-Ratte-Cy3-Antikörper (1:50, Dianova GmbH) und ein biotinylierter Esel-anti-Ziege-Antikörper (1:15; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA) verwendet. Die Farbgebung erfolgte durch Fluoreszein-gefärbtes Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Die Auswertung erfolgte mikroskopisch (BX-60, Olympus).

Die Gesamtzahl der CD31-positiven Mikrogefäße wurde im gesamten Endometrioseherd ausgezählt. Der Anteil der Mikrogefäße, die zusätzlich GFP-positiv waren, wurde in % der Gesamtzahl der CD31-positiven Gefäße angegeben.

5.9.6 Immunzellfärbung

CD68 ist ein Transmembranprotein, welches von Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Als immunhistochemischer Marker wird es vor allem zur Untersuchung von entzündetem Gewebe und Tumorgewebe angewandt (CHISTIAKOW et al., 2017). Der multimere transmembranöse Proteinkomplex CD3 definiert die T-Zelllinie und ist ihr effektivster Marker (RYAN, 2010). Myeloperoxidase (MPO) ist ein lysosomales Enzym der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten (PINKUS und PINKUS, 1991). Bei den Färbungen der einzelnen Immunzellen wurde als Primärantikörper ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (anti-CD68, anti-MPO oder anti-CD3) (1:100; Abcam) eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Ziegenanti-Kaninchen-Antikörper (1:50; Abcam). 3-Amino-9-Etylcarbazol (AEC) diente als Chromogen (AEC Substrate System, Abcam). Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalan. In vier regions of interest (ROIs) eines Schnittes wurde die Zahl CD3-, MPO- bzw. CD68-positiver Zellen bestimmt und durch die analysierte Gewebefläche geteilt, um so den Anteil der Immunzellen (in mm^{-2}) anzugeben.

5.10 Protein-Array

Jeweils 24 frisch isolierte Uterusfragmente oder Fragmente nach 24h bzw. 72h Präkultivierung wurden mittels eines Proteome-Profiler-Mouse-Angiogenesis-Array-Kits (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA) untersucht. Dies ermöglichte die Detektion von 53 Angiogenese-relevanten Proteinen. Zunächst wurden die Uterusfragmente lysiert (10 mM Tris pH 7.5; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,5 % Triton-X 100; 0,02 % NaN_3 , 0,2 mM PMSF; 1:75 v/v Proteaseinhibitor Cocktail und 1:100 v/v Phosphataseinhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)) und homogenisiert. Die Gewebelysate wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert (16,000xg). Der Überstand diente als Proteinextrakt. Jeweils 250 μg Protein pro Gruppe wurde für das Array benötigt. Die lysierten Proben wur-

den mit einem Cocktail biotinylierter Detektionsantikörper gemischt und bei Raumtemperatur für 1h inkubiert und nach Herstellerangaben weiterbehandelt. Die Auswertung erfolgte autoradiographisch (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland).

5.11 Experimentelles Protokoll

Um einen möglichen Einfluss hormoneller Schwankungen auf die Experimente auszuschließen, wurden in jedem Studienabschnitt nur Mäuse als Empfänger und Spender verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme und Transplantation der Uterus- bzw. Endometriumfragmente im Stadium des Östrus befanden. Die Bestimmung des Zyklusstadiums erfolgte mittels Vaginalzytologie.

5.11.1 Studienabschnitt I: Charakterisierung präkultivierter Uterusfragmente

Im ersten Studienabschnitt wurden insgesamt 87 Uterusfragmente aus 8 C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Os/J Mäusen isoliert. Jeweils ein Drittel der Fragmente wurde 24h oder 72h präkultiviert. Das letzte Drittel wurde nicht präkultiviert und diente als 0h-Kontrollgruppe. Nach Präkultivierung bzw. unmittelbar nach Isolierung wurden die Uterusfragmente histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Die Zelldichte wurde mittels HE-Färbung ausgewertet. Hierbei wurde die Gesamtzahl der Zellen in jeweils vier ROIs/Schnitt ($n = 5$) ermittelt und die Zelldichte in mm^{-2} angegeben. Zur quantitativen Analyse der Apoptoserate wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Marker Casp-3 durchgeführt. Jeweils fünf Gewebeschnitte pro Gruppe wurden lichtmikroskopisch analysiert und die positiven Zellen als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl der ausgewerteten Zellen angegeben. Die Ermittlung der Gefäßdichte (in mm^{-2}) erfolgte mit Hilfe der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung des Endothelzellmarkers CD31. Hierzu wurde die Fläche der Uterusfragmente (jeweils $n = 5$) ausgemessen und alle CD31-positiven Zellen ausgezählt. Von jeweils 24 Uterusfragmenten jeder Gruppe erfolgte eine Proteinexpressionsanalyse.

5.11.2 Studienabschnitt II: Modell der intraperitonealen Endometriose

Im zweiten Studienabschnitt wurden insgesamt 66 frisch isolierte bzw. 24h- und 72h-präkultivierte Uterusfragmente aus 4 C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Mäusen auf das Peritoneum von 11 C57BL/6-Mäusen transplantiert. Hierbei wurden jeweils zwei Uterusfragmente einer Gruppe randomisiert entweder an der rechten oder linken lateralen Bauchwand fixiert. Jeder Empfängermaus wurden somit sechs Uterusfragmente implantiert.

An Tag 0, 7, 14, 21 und 28 erfolgte die Vermessung der sich entwickelnden Endometrioseherde mittels hochauflösendem Ultraschall. Am Ende des Untersuchungszeitraums von 28 Tagen wurden die Herde zusätzlich mittels digitalen Messschiebers vermessen.

Es wurden folgende Parameter erhoben:

1. Größe der Endometrioseherde [mm²]
2. Gesamtvolumen der Herde [mm³]
3. Stromavolumen der Herde [mm³]
4. Zystenvolumen der Herde [mm³]
5. Wachstumsrate der Endometrioseherde [%] = $\frac{\text{Gesamtvolumen Tag X}}{\text{Gesamtvolumen Tag 0}} \cdot 100 - 100$
6. Wachstumsrate des Stromagewebes [%] = $\frac{\text{Stromavolumen Tag X}}{\text{Stromavolumen Tag 0}} \cdot 100 - 100$
7. Prozentualer Anteil der Herde mit Zysten pro Tier [%] = $\frac{\text{Anzahl der zystenhaltenden Herde}}{\text{Gesamtzahl der Herde}} \cdot 100$

Am Ende der in vivo Analysen wurden die Herde zusätzlich histologisch und immunhistochemisch analysiert. Zur morphologischen Begutachtung erfolgte zunächst eine HE-Färbung. Nur die Herde, die die charakteristischen Zeichen einer Endometriose zeigten (gut vaskularisiertes Stroma, zystisch dilatierte Drüsen), wurden weiter analysiert (n = 10 für frisch isolierte Uterusfragmente, die sich final zu einem Endometrioseherd entwickelten, n = 6 für die 24h-Gruppe und n = 1 für die 72h-Gruppe) und weiter untersucht. Da nur ein Herd der 72h-präkultivierten Gruppe eine typische Endometriosemorphologie aufwies, wurde diese Gruppe nicht in die statistischen Aus-

wertungen miteinbezogen. Es erfolgte weiter eine Bestimmung der Proliferationsrate mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki67 sowie eine quantitative Bestimmung der Apoptoserate. Die Ermittlung der Gefäßdichte (in mm^{-2}) erfolgte mit Hilfe der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung des Endothelzellmarkers CD31. Zusätzlich erfolgte eine CD31/GFP-Doppelfluoreszenzfärbung zur Quantifizierung der Gefäße, welche in den Endometriosherd eingewachsen waren (GFP-negativ) und derer, welche vom Endometrioseherd ausgingen (GFP-positiv). Des Weiteren wurden zur Analyse der Immunzellinfiltration immunhistochemische Färbungen zur Detektion von Makrophagen (CD68), neutrophilen Granulozyten (MPO) und Lymphozyten (CD3) durchgeführt.

5.11.3 Studienabschnitt III: Modell der Rückenhautkammer

Im dritten Studienabschnitt wurden insgesamt 27 frisch isolierte bzw. 24h- und 72h-präkultivierte Endometriumfragmente aus vier C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen in neun Rückenhautkammern von C57BL/6-Mäusen transplantiert. Die Transplantation erfolgte in randomisierter Anordnung. An Tag 0, 3, 6, 10 und 14 erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung. An den verschiedenen Messtagen wurde mit dem 5x Objektiv die Größe jedes Endometriumfragments bestimmt. Zusätzlich wurde eine Messung der vaskularisierten Fläche, d.h. des Anteils der Gesamtfläche des Endometriumfragments, der zu dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt bereits revaskularisiert war, durchgeführt. Die funktionelle Kapillardichte der Endometriumfragmente wurde mit dem 10x Objektiv gemessen. Dabei konnten Vergrößerungen von x115 und x230 auf dem Monitor erzielt werden. An Tag 14 wurden die Endometriumfragmente explantiert. Zunächst wurde eine HE-Färbung zur morphologischen Begutachtung angefertigt. Auch in diesem Studienabschnitt wurde die Anwachsrate bestimmt. Das heißt, dass wiederum nur die Herde in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen wurden, welche die Charakteristika einer Endometriose zeigten (n = 5 für 0h, n = 7 für 24h, n = 1 für 72h). In diesem Studienabschnitt zeigte ebenfalls nur ein Endometriumfragment der 72h-Gruppe eine typische Endometriosemorphologie, sodass diese Gruppe nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen wurde. Zur Quantifizierung der Gefäßdichte erfolgte eine immunhistochemische Färbung des Endothelzellmarkers CD31.

5.12 Statistik

Die deskriptive Statistik erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2019 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim). Die graphische Darstellung der Daten wurde mittels SigmaPlot (Version 13.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Software Pakets SigmaStat (Version 2.03; Jandel Scientific, San Jose, CA, USA). Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Bei Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen mit dem Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Lag keine Normalverteilung der Werte vor, wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Unterschiede zwischen drei experimentellen Gruppen wurden im Fall einer Normalverteilung mit einer one-way Analysis of variance (ANOVA) ermittelt, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls post-hoc-Test zur Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni. Bei nicht normalverteilten Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Zur Ermittlung von zeitabhängigen Unterschieden innerhalb einer Gruppe wurde bei Normalverteilung der Daten eine ANOVA für wiederholte Messungen angewendet. Im Fall von nicht parametrischen Daten wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen nach Friedmann angewendet. Zur Korrektur des alpha-Fehlers wurde ein Student-Newman-Keuls post-hoc Test eingesetzt. Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Sämtliche Werte wurden als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert \pm SEM) angegeben.

6 ERGEBNISSE

6.1 Charakterisierung präkultivierter Uterusfragmente

In einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Präkultivierung über 24h und 72h auf die Morphologie, Zelldichte, Mikrogefäßdichte und Apoptose in Uterusfragmenten untersucht. Als Vergleich wurde frisch isoliertes Gewebe (0h-präkultivierte Uterusfragmente) herangezogen. Hierzu wurden Uterusfragmente histologisch, immunhistochemisch und proteinbiochemisch untersucht.

6.1.1 Morphologie und Zelldichte

Um die Qualität des Gewebes zu analysieren, wurde zunächst sowohl die Morphologie als auch die Zelldichte der Uterusfragmente mittels HE-Färbung bestimmt. Bei frisch entnommenem Uterusgewebe war die typische Morphologie aus Myometrium, ausgebildeten Drüsenschläuchen und Stromazellen zu erkennen (Abb. 10A und D). Nach 24h Präkultivierung waren die Zellverbände weitgehend aufgelöst. Die glandulären Strukturen sowie der Anteil der Stromazellen waren deutlich reduziert. Zudem zeigte sich das Gewebe ödematös (Abb. 10B und E). Nach 72h Präkultivierung lagen aufgedehnte Nekrosen vor, und es konnten nur noch vereinzelte Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10C und F). Dies zeigte sich auch in einer reduzierten Zelldichte nach Präkultivierung. Die Zelldichte in den frisch isolierten Uterusfragmenten war mit $15.035 \pm 1.938 \text{ mm}^{-2}$ signifikant höher im Vergleich zum 72h-präkultivierten Gewebe mit $6.843 \pm 1.596 \text{ mm}^{-2}$. Eine tendenzielle Abnahme der Zellzahl konnte auch bereits in den 24h-präkultivierten Uterusfragmenten beobachtet werden ($11.740 \pm 903 \text{ mm}^{-2}$).

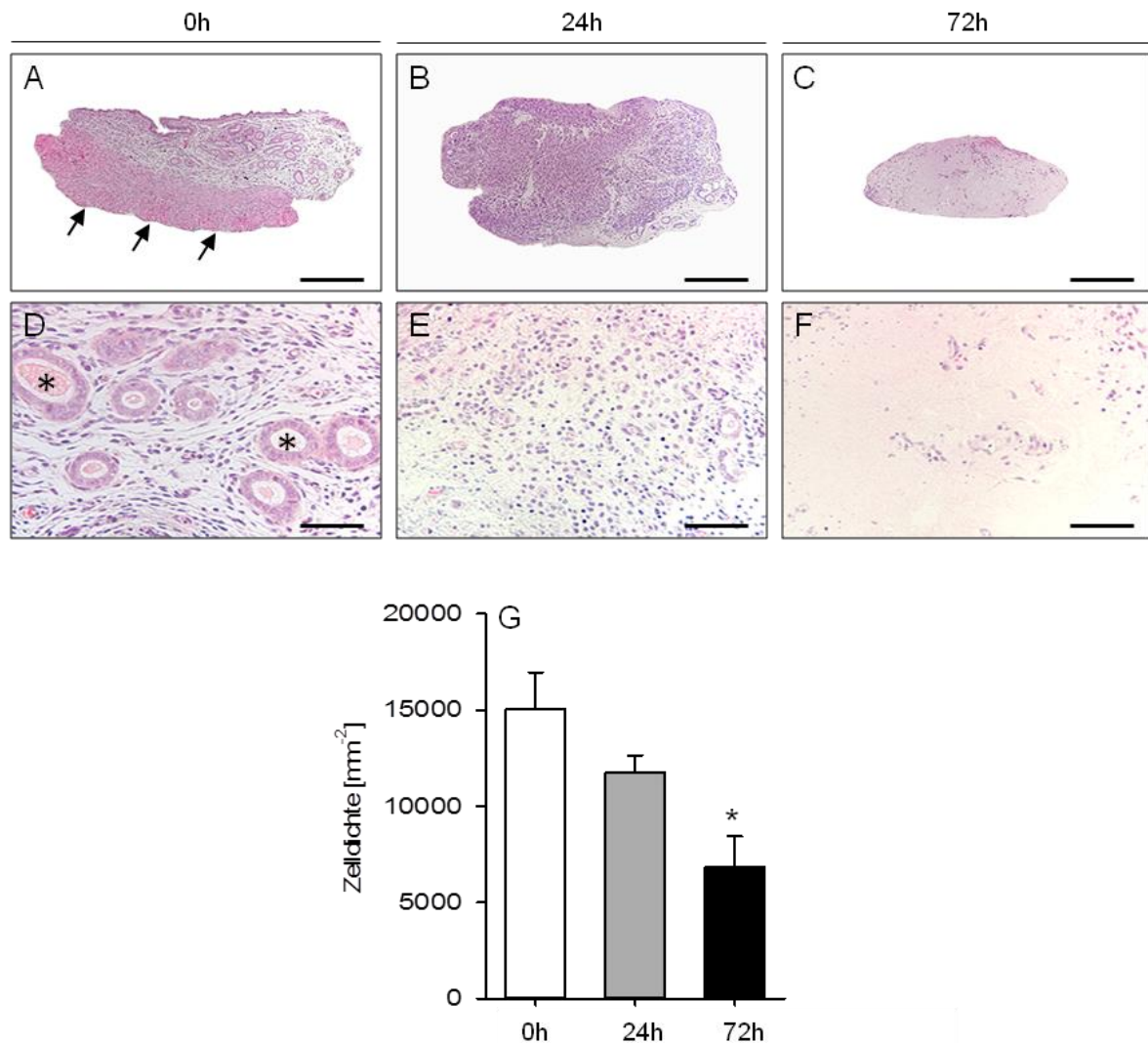


Abbildung 10: HE-gefärbte Schnitte von frisch isolierten, 24h-präkultivierten und 72h-präkultivierten Uterusfragmenten von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen zur Detektion morphologischer Unterschiede. **A, D:** Frisch isoliertes Uterusfragment mit typischen Drüsenstrukturen (Sternchen) und gut abgrenzbarem Myometrium (Pfeile). **B, E:** 24h-präkultiviertes Uterusfragment mit reduzierter Zelldichte, annähernd aufgelöstem Übergang zwischen Myo- und Endometrium und aufgelösten Drüsenstrukturen. **C, F:** 72h-präkultiviertes Uterusfragment mit deutlich reduzierter Zahl an Stromazellen. Drüsenformationen sind nicht mehr zu erkennen. **G:** Zelldichte (in mm⁻²) der frisch isolierten (0h, weiße Säule), 24h- (graue Säule) und 72h-präkultivierten (schwarze Säule) Uterusfragmente (jeweils n = 5). Mittelwert ± SEM; *p < 0,05 vs. 0h. Maßstab: A-C = 300 µm, D-F = 60 µm.

6.1.2 Mikrogefäßdichte

Zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte wurde eine immunhistochemische Färbung zum Nachweis des Endothelzellmarkers CD31 durchgeführt und anschließend quantitativ ausgewertet (Abb. 11A-D). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Präkultivierung über 24h keinen Einfluss auf die Dichte ($193 \pm 31 \text{ mm}^{-2}$) der vorhandenen Blutgefäße im Vergleich zu den frisch isolierten Uterusfragmenten ($172 \pm 25 \text{ mm}^{-2}$) hatte. Jedoch war die Mikrogefäßdichte nach 72h Präkultivierung

($34 \pm 12 \text{ mm}^{-2}$) signifikant niedriger im Vergleich zu frisch isolierten und 24h-präkultivierten Fragmenten.

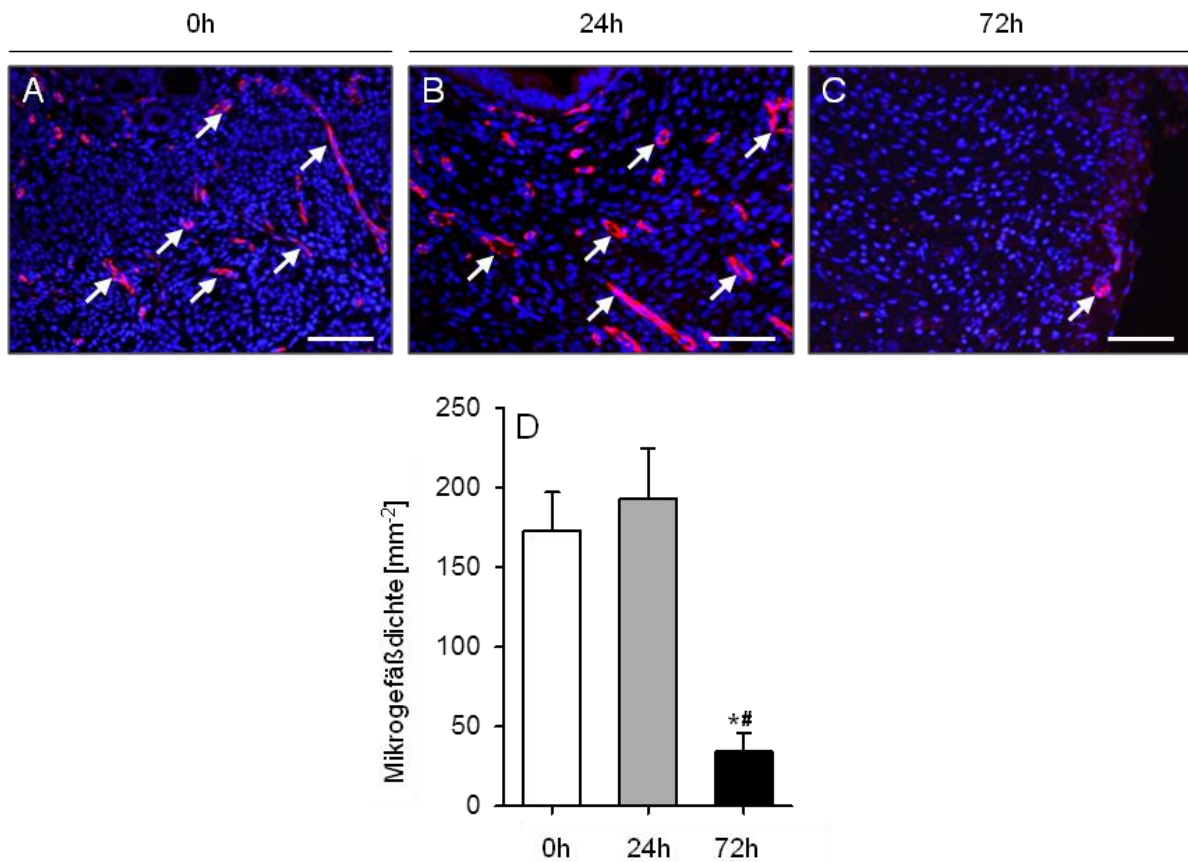


Abbildung 11: A-C: Immunfluoreszenzfärbung CD31-positiver Gefäße von frisch isolierten (A), 24h- (B) und 72h-präkultivierten Uterusfragmenten (C) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen zur Ermittlung der Gefäßdichte. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (rot). Es ist deutlich zu erkennen, dass die 24h-präkultivierten Fragmente im Vergleich zu den frisch isolierten Fragmenten, eine vergleichbare Anzahl an CD31⁺-Gefäßen (Pfeile) aufweisen, während die 72h-präkultivierten Fragmente nur noch vereinzelte Blutgefäße enthalten. Maßstab: 200 μm . D: Mikrogefäßdichte (in mm^{-2}) der frisch isolierten (0h, weiße Säule) sowie der 24h- (graue Säule) und 72h-präkultivierten Uterusfragmente (schwarze Säule) (jeweils $n = 5$). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. 0h; # $p < 0,05$ vs. 24h.

6.1.3 Apoptoserate

Weiterhin wurde der Einfluss einer Präkultivierung auf die Apoptoserate der stromalen Zellen in den Uterusfragmenten untersucht. Die quantitative Analyse der Casp-3-positiven Zellen zeigte eine zunehmende Apoptoserate in den präkultivierten Fragmenten (Abb. 12A-C). Während in frisch isoliertem Gewebe die Apoptoserate mit $0,47 \pm 0,18 \%$ vergleichsweise gering war, stieg der Anteil apoptischer Zellen nach 24h Präkultivierung auf $1,82 \pm 0,55 \%$. Ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate

konnte mit $12,34 \pm 3,50$ % in den 72h-präkultivierten Uterusfragmenten nachgewiesen werden.

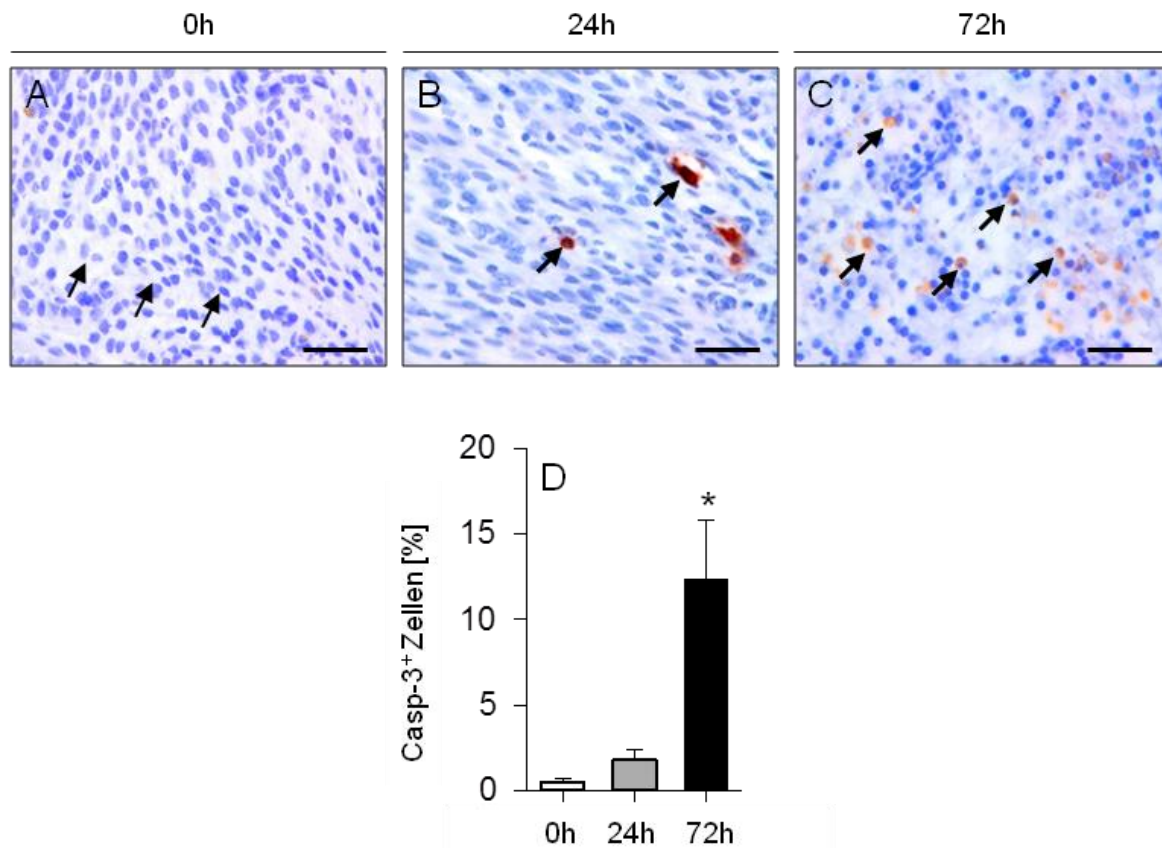


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von frisch isolierten (A) sowie von 24h- (B) und 72h-präkultivierten Uterusfragmenten (C) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen zur Detektion apoptotischer Casp-3⁺ Zellen. Die Färbung erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen Casp-3. Es zeigt sich, dass die Zahl Casp-3⁺ Zellen (Pfeile) mit der Präkultivierungszeit steigt. Maßstab: 30 µm. D: Anteil Casp-3⁺ Zellen (in %) der frisch isolierten (0h, weiße Säule) sowie der 24h- (graue Säule) und 72h-präkultivierten Uterusfragmente (schwarze Säule) (jeweils n = 5). Mittelwert ± SEM; *p < 0,05 vs. 0h.

6.1.4 Protein-Array

Mit Hilfe eines Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Arrays wurden 53 Angiogenese-relevante Proteine in den Uterusfragmenten untersucht. Hierbei wurden frisch isolierte sowie 24h- und 72h-präkultivierte Uterusfragmente verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Proben alle Proteine exprimiert wurden und in den präkultivierten Proben ein vergleichsweise großer Anteil hochreguliert wurde (Tab. 1). Die höchsten Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle konnten nach 24h Präkultivierung für cysteine rich angiogenic inducer 61 (CYR61) und nach 72h Präkultivierung für keratinocyte chemoattractant (KC) nachgewiesen werden (Abb. 13). Interessanterweise war die Expression von KC in der 24h-Gruppe deutlich geringer als in der

72h-Gruppe. Dies gilt auch für monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), placental growth factor-2 (PIGF-2), Interleukin-1-alpha (IL-1alpha) und tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) (Tab. 1).

Table 1: Expression pro-angiogener Proteine (in % zur 0h- Kontrolle) in 24h- und 72h-präkultivierten Uterusfragmenten, die im Proteom-Profiler-Maus-Angiogenese Array detektiert wurden.

Protein	Expression (% zur Kontrolle)	
	24h	72h
Cyr61/CCN1, IGFBP-10	2180,7	2711,0
KC/CXCL1/CINC-1/GRO-alpha	1771,1	15458,7
ADAMTS1/METH1	1244,7	1631,7
Thrombospondin-2/TSP-2	1007,1	1939,8
MCP-1/CCL2/JE	902,0	1825,1
DLL4	844,3	682,6
DPP IV/CD26	603,7	554,3
PIGF-2	564,2	1795,7
Amphiregulin/AR	556,4	484,4
MMP-3	523,8	590,2
Serpin E1/PAI-1	496,8	452,0
IL-1alpha	477,3	2175,4
Osteopontin/OPN	472,7	435,7
KGF/FGF-7	468,0	920,4
Endoglin/CD105	371,1	337,9
GM-CSF	333,0	388,8
Fractalkine/CX3CL 1	302,9	284,8
HB-EGF	298,2	237,3
TIMP-1	295,3	1013,5
PDGF-AA	273,7	455,2
IP-10/CXCL 10	262,4	223,1
Angiopoietin-1/Ang-1	253,2	228,8
IGFBP-3	225,6	215,8

Pentraxin-3/PTX3/TSG-14	210,0	246,4
Endothelin-1/ET-1	200,8	428,2
PDGF-AB/BB	196,8	246,6
Platelet Factor 4/CXCL4/PF4	194,0	428,2
VEGF/VPF	190,1	221,0
FGF acid/FGF-1/ECGF/HBGF-1	177,4	149,4
MIP-1alpha	168,5	258,1
IL-10/CSIF	156,5	175,8
Angiopoietin-3/Ang-3	156,1	148,9
VEGF B/VRF	151,7	127,9
Proliferin	150,1	142,0
Endostatin/Collagen VIII	148,7	145,4
HGF	146,6	137,5
CXCL 16	135,2	285,6
PD-ECGF	123,8	167,8
Angiogenin/ANG	121,0	155,1
Leptin/OB	119,6	129,6
Prolactin/PRL	115,2	123,9
FGF basic/FGF-2	114,8	145,0
IL-1beta	111,9	79,5
IGFBP-2	111,9	126,1
TIMP-4	105,6	105,9
IGFBP-1	99,0	91,5
NOV/CCN3/IGFBP-9	98,6	188,0
MMP-9	95,5	104,9
Coagulator Factor III/Tissue Factor/TF	95,4	102,5
MMP-8	89,6	101,6
SDF-1/CXCL 12	88,8	104,4
EGF	88,3	64,7
Serpin F1/PEDF	79,4	134,3

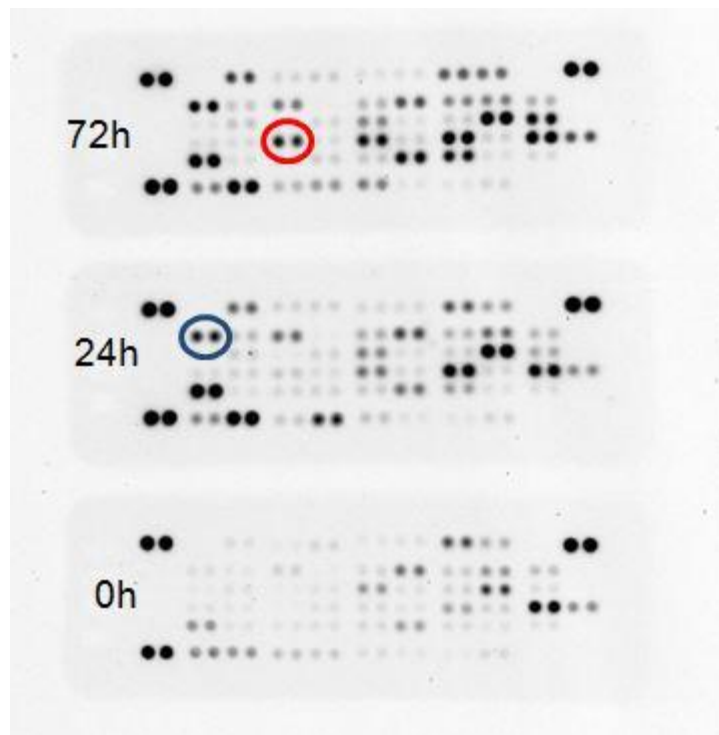


Abbildung 13: Nitrozellulosemembran des Protein-Arrays von frisch isolierten, 24h- und 72h-präkultivierten Uterusfragmenten mit an definierten Punkten gespotteten Fänger- und Kontrollantikörpern und nach Inkubation mit den Zellysaten, den Detektionsantikörpern und dem sekundären Detektionsreagenz. Die Quantifizierung erfolgte über die mittlere Spot-Pixeldichte. Mit Hilfe eines Koordinatensystems lässt sich die Lokalisation der verschiedenen Angiogenesefaktoren ablesen. Blau umkreist sind in der Abbildung die Koordinaten von CYR 61 (24h) und rot umkreist die Koordinaten von KC (72h).

6.2 Auswirkungen einer Präkultivierung auf die Entwicklung intraperitonealer Endometrioseherde

In einem zweiten Studienabschnitt wurden die Auswirkungen einer Präkultivierung auf die Morphologie, die Anwachsrate, das Wachstum, die Mikrogefäßdichte, die Apoptose, die Proliferation sowie die Immunzellinfiltration sich neu entwickelnder intraperitonealer Endometrioseherde untersucht. Zur Analyse der Größenentwicklung der induzierten Endometrioseherde wurden repetitive Ultraschallanalysen durchgeführt. Zudem wurden die Endometrioseherde am Tag der Explantation (Tag 28) mittels Schieblehre vermessen. Schlussendlich erfolgten nach Exzision der Herde an Tag 28 histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

6.2.1 Wachstum der Endometrioseherde

Nicht jedes Uterusfragment hatte sich am Tag 28 zu einem Endometrioseherd mit typischer Morphologie, charakterisiert durch gut vaskularisiertes Stroma und zystisch veränderte Drüsen (Abb. 14A-C), entwickelt. Es wurden insgesamt 66 Uterusfragmente auf das Peritoneum transplantiert. Bei der Explantation an Tag 28 zeigten 17 von 22 der frisch isolierten Uterusfragmente (77,3 %), 8 von 22 der 24h-präkultivierten Uterusfragmente (36,4 %) und 1 von 22 der 72h-präkultivierten Uterusfragmente (4,5 %) eine typische Endometriosemorphologie in der HE-Färbung (Abb. 14A-D). Da in der 72h-Gruppe nur ein singulärer Herd eine typische Endometriosemorphologie aufwies, wurde diese Gruppe aus den weiteren statistischen Auswertungen ausgeschlossen.

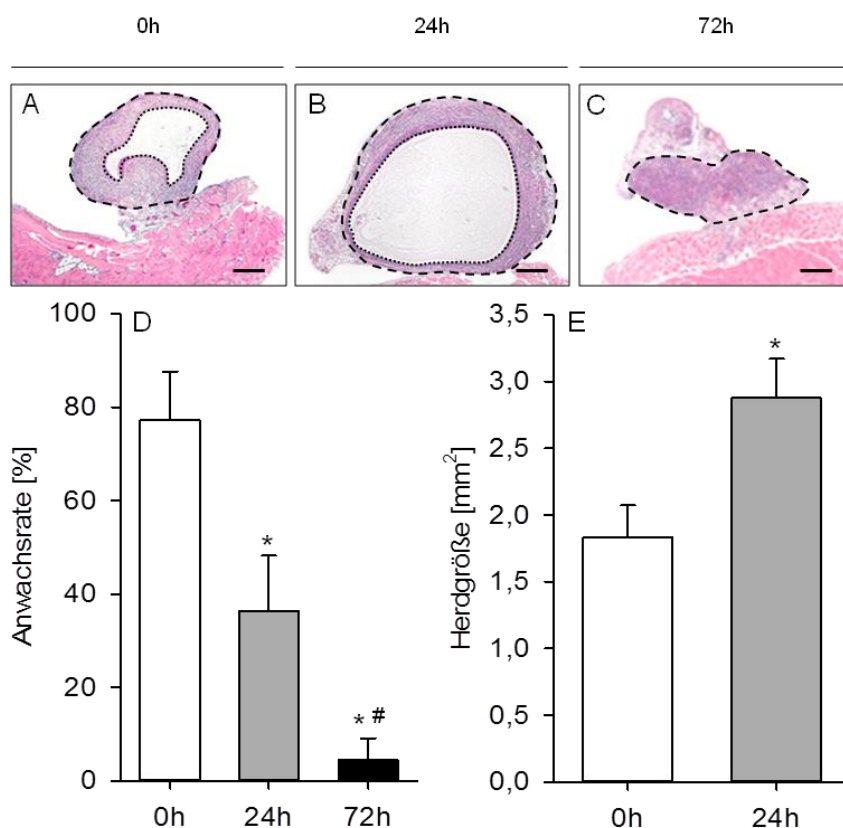


Abbildung 14: A-C: HE-Färbung von frisch isolierten (A) sowie von 24h- (B) und 72h-präkultivierten (C) Uterusfragmenten von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen. Anhand der HE-Färbung erfolgte an Tag 28 die Bestimmung der Uterusfragmente, die eine typische Endometriosemorphologie aufwiesen. Maßstab: 200 μ m. D: Anwachsrate (in %) der frisch isolierten (0h, weiße Säule) sowie der 24h- (graue Säule) und 72h-präkultivierten Uterusfragmente (schwarze Säule) (jeweils n = 11) mit typischer Endometriosemorphologie. E: Größe (in mm²) der frisch isolierten (0h, weiße Säule, n = 10) und der 24h-präkultivierten Uterusfragmente (graue Säule; n = 6) an Tag 28 nach Transplantation, welche die typische Morphologie einer Endometriose zeigten. Mittelwert \pm SEM; *p < 0,05 vs. 0h; #p < 0,05 vs. 24h.

Ohne Präkultivierung entwickelten sich signifikant mehr Uterusfragmente zu typischen Endometrioseherden als nach 24h Präkultivierung. Vor Explantation der Endometrioseherde an Tag 28 wurden diese mittels Schieblehre vermessen. Die 24h-präkultivierten Endometrioseherde wiesen eine Fläche von $2,88 \pm 0,29 \text{ mm}^2$ und die nicht präkultivierten eine Fläche von $1,83 \pm 0,24 \text{ mm}^2$ auf. Dies zeigt, dass eine Präkultivierung über 24h das Größenwachstum der Endometrioseherde signifikant förderte.

Die sich neu entwickelnden Endometrioseherde wurden mittels hochauflösendem Ultraschall an Tag 0, 7, 14, 21 und 28 untersucht (Abb. 15A und B). Nur die Uterusfragmente, die sich in der HE-Färbung als typische Endometrioseherde erwiesen, gingen in diese Untersuchung ein.

Die Ultraschallanalyse ergab zu allen Untersuchungszeitpunkten, dass das Gesamtvolumen der Endometrioseherde signifikant größer war als an Tag 0. Dies galt sowohl für die frisch isolierten als auch für die 24h-präkultivierten Uterusfragmente, die sich zu Endometrioseherden entwickelt hatten (Abb. 15C und D).

Wenn man das Stromawachstum betrachtet, so war in beiden Gruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten das Stromavolumen signifikant größer als an Tag 0 (Abb. 15E und F). In der 24h-präkultivierten Gruppe zeigten sich an Tag 14, 21 und 28 signifikant mehr zystenenthaltende Endometrioseherde als an Tag 0 (Abb. 15H). Das Gesamtvolumen der Endometrioseherde der 24h-Gruppe war sowohl an Tag 21, als auch an Tag 28 signifikant größer als das Volumen der Endometrioseherde der nicht-präkultivierten Gruppe (Abb. 15C). Dies resultiert aus dem signifikant geringeren Stromavolumen der 0h-Gruppe an Tag 21 und 28 (Abb. 15E). Die Anzahl der zystenenthaltenden Endometrioseherde erwies sich an Tag 28 in der 24h-präkultivierten Gruppe signifikant größer als in der nicht präkultivierten Gruppe (Abb. 15H). Das Zystenvolumen war nur an Tag 14 in der 24h-präkultivierten Gruppe signifikant größer als in der nicht präkultivierten Gruppe (Abb. 15G).

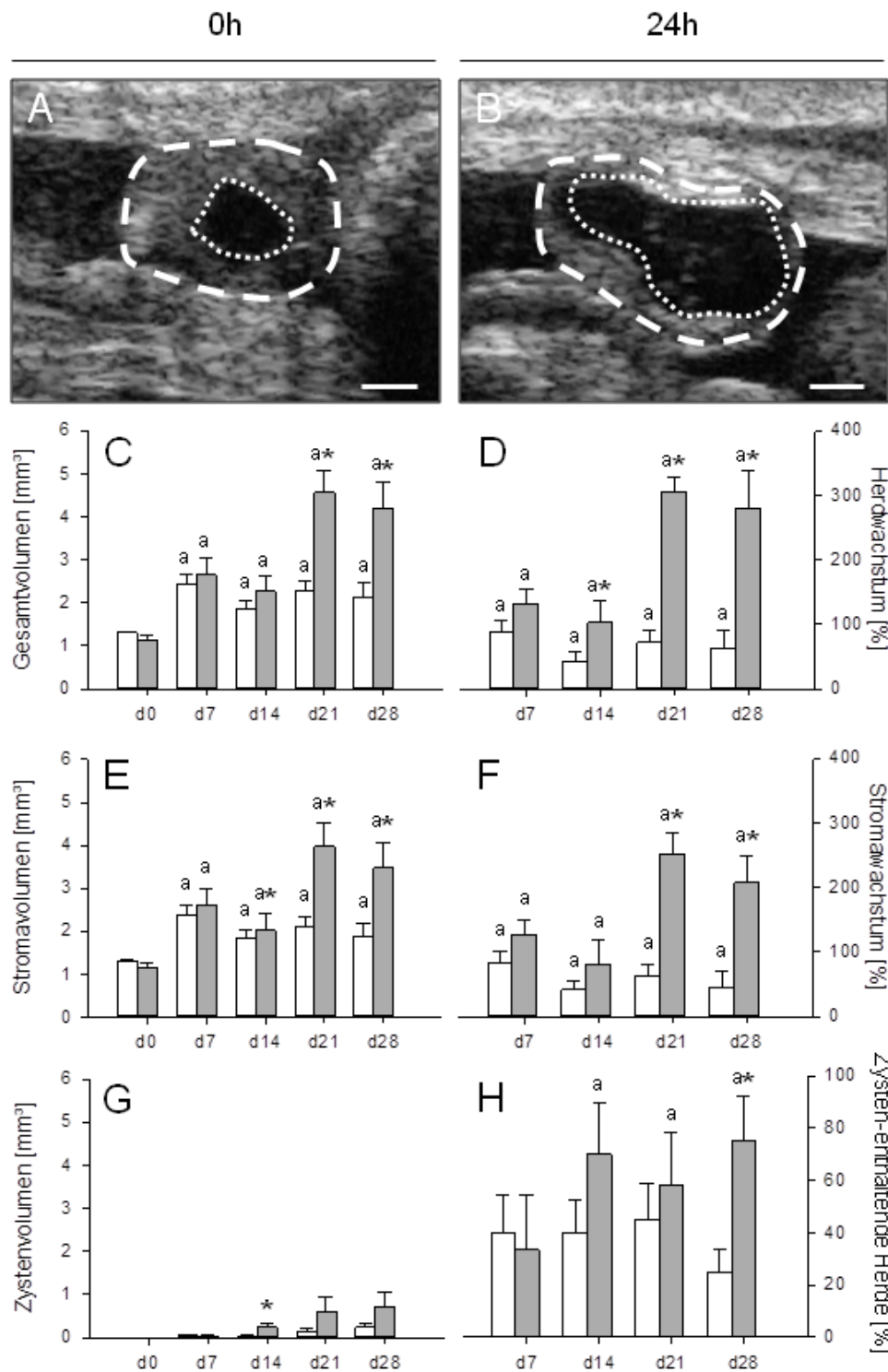


Abbildung 15: **A, B:** Hochauflösende Ultraschalluntersuchung an Tag 28 nach Transplantation von frisch isolierten (**A**) und 24h-präkultivierten Uterusfragmenten (**B**) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen an die Bauchwand von C57BL/6 Mäusen, die sich nach 28 Tagen zu Endometrioseherden entwickelt hatten. Die Begrenzung der Endometrioseherde ist durch die gestrichelten Linien markiert, die Zystengrenzen mittels gepunkteter Linien. Maßstab: 1 mm. **C-H:** Gesamtvolumen (in mm³) (**C**), Herdwachstum (in %) (**D**), Stromavolumen (in mm³) (**E**), Stromawachstum (in %) (**F**), Zystenvolumen (in mm³) (**G**) und Zysten-enthaltende Herde in % (**H**) von Uterusfragmenten unmittelbar (d0) sowie an Tag 7, 14, 21 und 28 nach Transplantation von frisch isolierten (0h, weiße Säulen, n = 10) und 24h- präkultivierten Uterusfragmenten (graue Säulen, n = 6), die sich an Tag 28 zu Endometrioseherden entwickelt hatten. Mittelwerte ± SEM; *p < 0,05 vs. 0h; ^ap < 0,05 vs. Tag 0 der gleichen Gruppe.

6.2.2 Vaskularisierung der Endometrioseherde

Die Gefäßdichte in den Endometrioseherden wurde fluoreszenzmikroskopisch nach immunhistochemischer Markierung mit CD31 bestimmt (Abb. 16A und B). An Tag 28 waren die Gefäßdichten in den Endometrioseherden beider Gruppen vergleichbar (frisch isoliert: $168 \pm 12 \text{ mm}^{-2}$ vs. 24h-präkultiviert: $177 \pm 15 \text{ mm}^{-2}$).

Mittels immunhistochemischer Doppelfluoreszenzfärbung zur Markierung von CD31/GFP-positiven Gefäßen konnte die Herkunft der Mikrogefäße (implantierter Herd vs. Peritoneum) bestimmt werden (Abb. 16D und E). Dabei zeigte sich, dass in der 0h-Gruppe $74,2 \pm 2,5 \%$ der Mikrogefäße vom Endometrioseherd ausgingen, d.h. GFP-positiv waren. Bei den Endometrioseherden der 24h-präkultivierten Uterusfragmente waren $70,3 \pm 6,6 \%$ GFP-positiv. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 16 F).

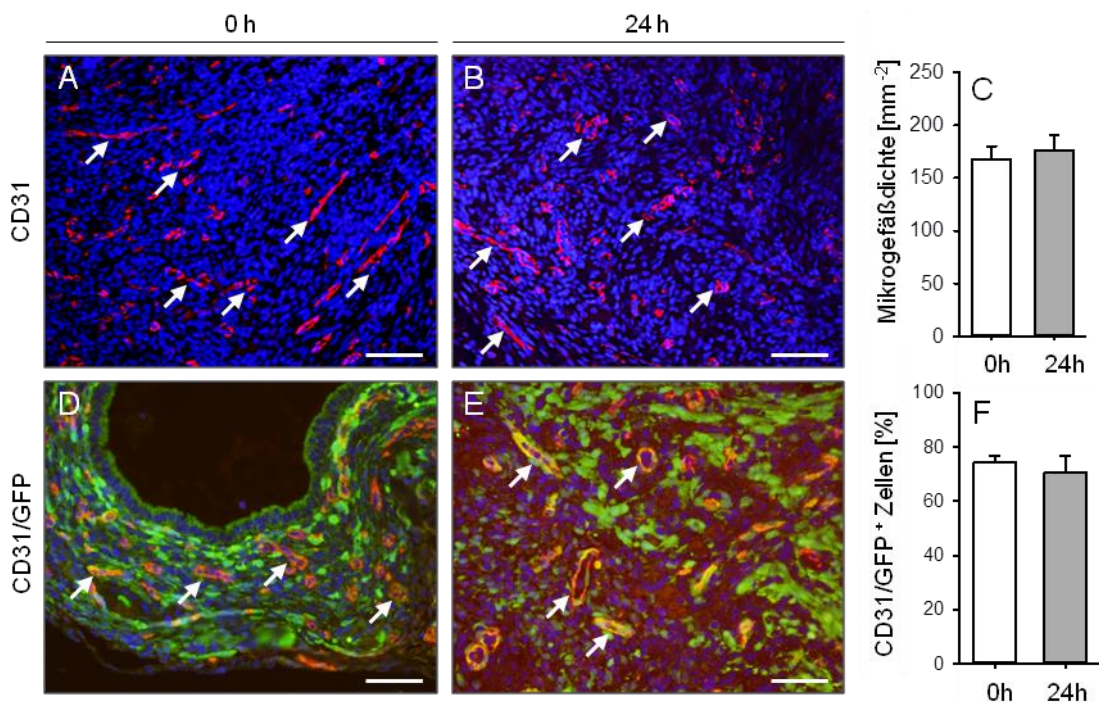


Abbildung 16: **A, B, D, E:** Immunfluoreszenzfärbung CD31-positiver Gefäße (**A, B**) und Immundoppelfluoreszenzfärbung zur Markierung von CD31/GFP-positiven Gefäßen (**D, E**) in frisch isolierten (**A, D**) und 24h-präkultivierten Uterusfragmenten (**B, E**) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen an Tag 28 nach Transplantation an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen, die sich zu typischen Endometrioseherden entwickelt hatten. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau), einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (rot) und einem Antikörper gegen GFP zur Detektion der GFP-positiven Endothelzellen (grün). Es zeigt sich eine annähernd gleiche Anzahl CD31-positiver sowie CD31/GFP-positiver Gefäße (Pfeile) in beiden Gruppen. **A-B:** Maßstab: 60 μm , **D-E:** Maßstab: 40 μm . **C:** Mikrogefäßdichte (in mm^{-2}) der frisch isolierten (weiße Säule, $n = 10$) und 24h-präkultivierten Uterusfragmente (graue Säule; $n = 6$). **F:** Anteil CD31/GFP-positiver Zellen (in %) der frisch isolierten (0h, weiße Säule, $n = 10$) und 24h-präkultivierten Uterusfragmente (graue Säule; $n = 6$). Mittelwert \pm SEM.

6.2.3 Proliferation und Apoptose in den Endometrioseherden

Die proliferativen Zellen in den Endometrioseherden wurden mittels des Proliferationsmarkers Ki67 detektiert (Abb. 17A und B). Hierbei wurde zwischen Stromazellen und Drüsenzellen differenziert. Die Proliferationsrate der Drüsenzellen der frisch isolierten Uterusfragmente betrug $33,32 \pm 12,45 \%$ und der 24h-präkultivierten Fragmente $36,44 \pm 10,98 \%$ und war somit vergleichbar. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant erhöhte Proliferationsrate der Stromazellen in den Herden der 24h-präkultivierten Gruppe detektiert werden ($9,4 \pm 1,7 \%$ vs. $5,9 \pm 0,9 \%$) (Abb. 17C). Nach immunhistochemischer Färbung von Casp-3 wurde die Apoptoserate ermittelt (Abb.17D und E). In der 0h-Gruppe konnte ein Anteil von $0,42 \pm 0,11 \%$ Casp-3-positiven Zellen, in der 24h-Gruppe ein Anteil von $0,22 \pm 0,04 \%$ nachgewiesen werden. Damit war auch die Apoptoserate beider Gruppen vergleichbar (Abb. 17F).

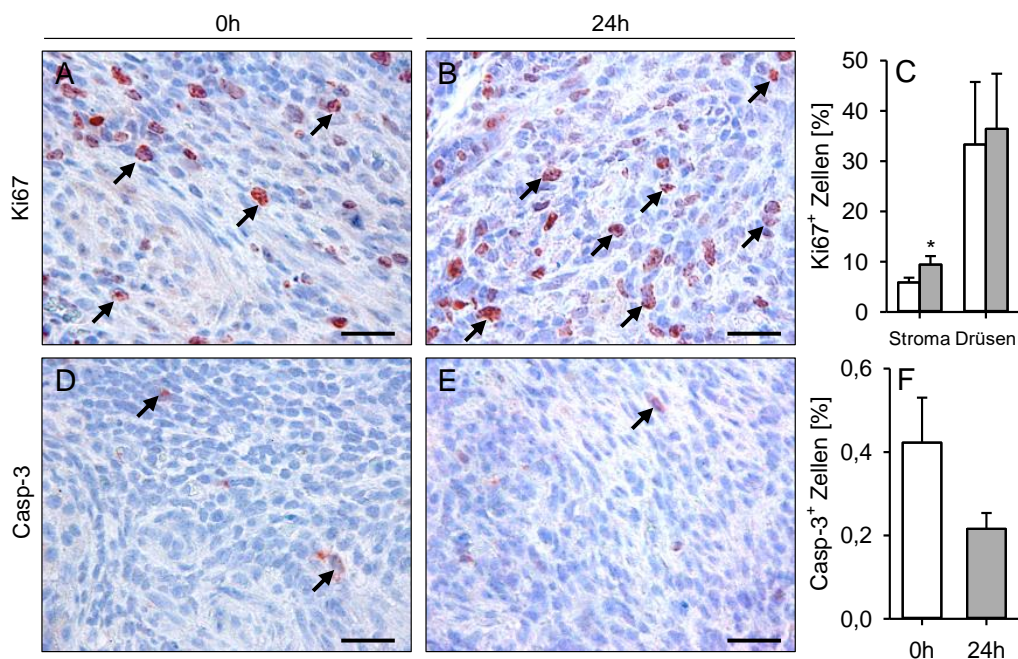


Abbildung 17: **A, B, D, E:** Immunhistochemische Färbung von Ki67⁺- (**A, B**) und Casp3⁺-Zellen (**D, E**) in frisch isolierten (**A, D**) und 24h-präkultivierten Uterusfragmenten (**B, E**) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen an Tag 28 nach Transplantation an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen, die sich zu typischen Endometrioseherden entwickelt hatten. Die Pfeile markieren die Ki67⁺- und die Casp3⁺-Zellen. **A, B, D, E:** Maßstab: 25 µm. **C:** Anteil Ki67⁺-Zellen (in %) der frisch isolierten (0h, weiße Säule, n = 10) und 24h-präkultivierten Uterusfragmente (graue Säule; n = 6) im Stroma und in den Drüsen. **F:** Anteil Casp3⁺-Zellen (in %) der frisch isolierten (0h, weiße Säule, n = 10) und 24h-präkultivierten Uterusfragmente (graue Säule; n = 6). Mittelwerte ± SEM; *p < 0,05 vs. 0h.

6.2.4 Entzündungsprozesse im Gewebe

Die Endometriose wird als eine entzündliche Erkrankung angesehen (RICCIO et al., 2018). Bei allen Typen der Erkrankung werden Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde das Ausmaß der Entzündung im Gewebe mittels CD3 (T-Lymphozyten-Marker) (Abb. 18A und B), MPO (Marker für neutrophile Granulozyten) (Abb. 18C und D) und CD68 (Makrophagen-Marker) (Abb. 18E und F) bestimmt.

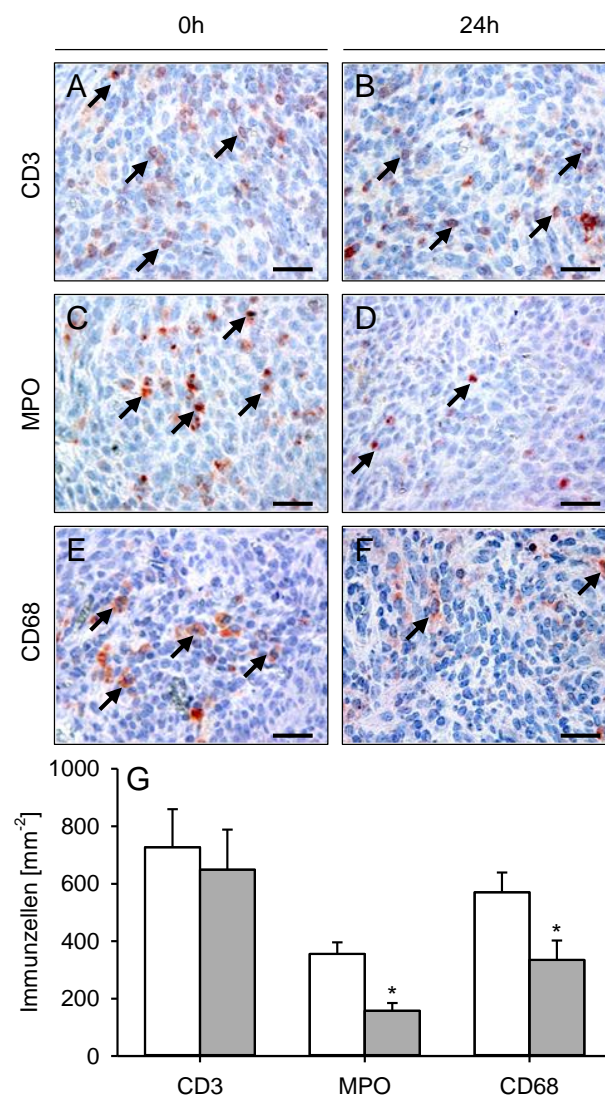


Abbildung 18: A-F: Immunhistochemische Färbung von CD3⁺-Lymphozyten (A, B), MPO⁺-neutrophilen Granulozyten (C, D) und CD68⁺-Makrophagen (E, F) in frisch isolierten (A, C, E) und 24h-präkultivierten Uterusfragmenten (B, D, F) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Mäusen an Tag 28 nach Transplantation an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen, die sich zu typischen Endometrioseherden entwickelt hatten. Die Immunzellen sind jeweils mit Pfeilen markiert. Maßstab: 25 µm. G: CD3⁺-Lymphozyten, MPO⁺-neutrophile Granulozyten und CD68⁺-Makrophagen (jeweils in %) der frisch isolierten (0h, weiße Säule, n = 10) und 24h-präkultivierten Uterusfragmente (graue Säule; n = 6). Mittelwerte ± SEM; *p < 0,05 vs. 0h.

Die T-Zellinfiltration zeigte in den Herden beider Gruppen (0h-Gruppe vs. 24h-Gruppe) keinen signifikanten Unterschied ($727 \pm 133 \text{ mm}^{-2}$ vs. $649 \pm 140 \text{ mm}^{-2}$) (Abb. 18G). Die Anzahl CD68-positiver Makrophagen war in der 0h-Gruppe signifikant höher ($570 \pm 69 \text{ mm}^{-2}$) als in der 24h-präkultivierten Gruppe ($335 \pm 68 \text{ mm}^{-2}$) (Abb. 18G). In gleicher Weise war die Anzahl MPO-positiver Granulozyten in der nicht präkultivierten Gruppe signifikant höher ($356 \pm 41 \text{ mm}^{-2}$) als in der 24h-präkultivierten Gruppe ($158 \pm 27 \text{ mm}^{-2}$) (Abb. 18G).

6.3 Endometriose in der Rückenhautkammer

In einem dritten Studienabschnitt wurde der Einfluss einer Präkultivierung von Endometriumfragmenten auf deren Vaskularisierung untersucht. Hierzu wurde das Modell der Rückenhautkammer angewandt. Zur Größenmessung der Transplantate und zur Quantifizierung ihrer Vaskularisierung wurde eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Des Weiteren erfolgte zur zusätzlichen Bestimmung der Mikrogefäßdichte in den Transplantaten eine immunhistochemische Detektion von CD31-positiven Endothelzellen.

6.3.1 Vaskularisierung und Größenentwicklung der Endometrioseherde

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie dient zur Analyse der Vaskularisierung in vivo. Sie erfolgte an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer zur Induktion von Endometrioseherden. Es gingen nur die Herde in die Auswertung ein, die sich in der abschließenden HE-Färbung als typische Endometrioseherde zeigten. In der 0h-Gruppe wiesen 63 % der transplantierten Endometriumfragmente die typische Morphologie einer Endometriose auf. In der 24h-Gruppe waren es 78 %. Ein singuläres 72h-präkultiviertes Endometriumfragment (12,5 %), welches sich als typischer Endometrioseherd präsentierte, wurde aus allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Die funktionelle Kapillardichte in den Endometrioseherden zeigte in der 0h-Gruppe an den Tagen 6, 10 und 14 jeweils eine signifikante Zunahme gegenüber Tag 0. In der Gruppe der 24h-präkultivierten Endometriumfragmente zeigte die funktionelle Kapillardichte an den Tagen 10 und 14 eine signifikante Zunahme verglichen mit Tag 0. Zwischen den bei-

den Gruppen fand sich nur an Tag 14 ein signifikanter Unterschied der funktionellen Kapillardichte (0h-Gruppe $224 \pm 15 \text{ cm/cm}^2$ vs. 24h-Gruppe $273 \pm 11 \text{ cm/cm}^2$) (Abb 19C).

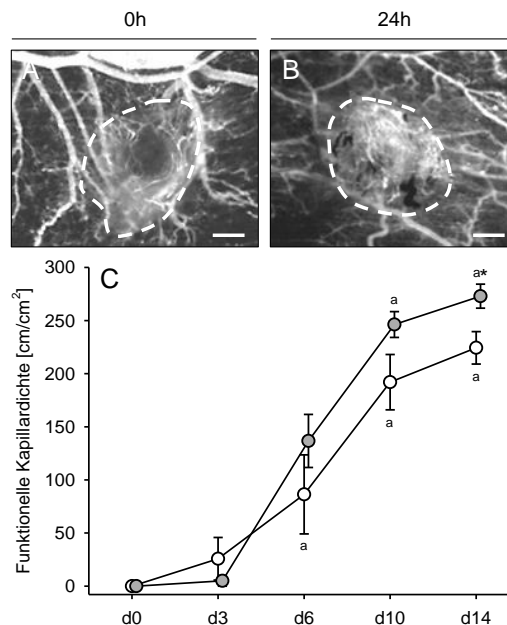


Abbildung 19: A, B: Darstellung des Blutgefäßnetzwerks eines frisch isolierten (A) und 24h-präkultivierten Endometriumfragments (B) in der Rückenhautkammer einer C57BL/6-Maus an Tag 14 nach Transplantation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie nach retrobulbärer Injektion von FITC-Dextran. Die Grenzen der Endometriumfragmente sind durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet. Beide Fragmente zeigten in der HE-Färbung eine typische Endometriosemorphologie. Maßstab: $300 \mu\text{m}$ **C:** Funktionelle Kapillardichte (in cm/cm^2) am Tag der Transplantation (d0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation der frisch isolierten (0h, weiße Punkte, $n = 6$) und 24h-präkultivierten Endometriumfragmente (graue Punkte, $n = 7$). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. 0h, $^a p < 0,05$ vs. d0 der gleichen Gruppe.

Die Größe der Endometrioseherde, die sich aus frisch isolierten und 24h-präkultivierten Endometriumfragmenten entwickelten, war an allen Untersuchungsstagen vergleichbar. Weiterhin konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikantes Wachstum der Herde verglichen mit Tag 0 nachgewiesen werden (Tab.2). Die vaskularisierte Fläche innerhalb der Endometrioseherde aus nicht präkultivierten Fragmenten zeigte bei den Messungen an Tag 10 und 14 jeweils eine signifikante Größenzunahme im Vergleich zu Tag 0. In der Gruppe der Herde aus 24h-präkultivierten Fragmenten fanden sich an den Tagen 6, 10 und 14 signifikante Größenzunahmen der vaskularisierten Flächen (Tab. 2). Zu keinem Zeitpunkt gab es einen signifikanten Unterschied in der vaskularisierten Fläche zwischen der 0h-Gruppe und der 24h-Gruppe.

Tabelle 2: Größe der Endometriumfragmente (in mm²) am Tag der Transplantation (Tag 0) und an den Tagen 3, 6, 10 und 14 sowie deren vaskularisierte Fläche (in mm²) innerhalb der frisch isolierten (n = 6) und 24h-präkultivierten Endometriumfragmente (n = 7) von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J-Mäusen in der Rückenhaulammer von C57BL/6-Mäusen. Mittelwert ± SEM, ^ap <0,05 vs. Tag 0.

	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
Größe der Endometriumfragmente in mm²					
0h-Gruppe	1,26 ± 0,16	1,40 ± 0,17	1,52 ± 0,20	1,45 ± 0,14	1,48 ± 0,12
24h-Gruppe	1,42 ± 0,05	1,55 ± 0,09	1,51 ± 0,08	1,48 ± 0,10	1,47 ± 0,11
Vaskularisierte Fläche in mm²					
0h-Gruppe		0,07 ± 0,06	0,86 ± 0,39	1,24 ± 0,25 ^a	1,46 ± 0,12 ^a
24h-Gruppe		0,02 ± 0,20	0,88 ± 0,13 ^a	1,25 ± 0,15 ^a	1,44 ± 0,11 ^a

Die immunhistochemische Analyse der CD31-Färbung an Tag 14 nach Transplantation der Endometriumfragmente zeigte keinen signifikanten Unterschied der Mikrogefäßdichten zwischen den beiden Gruppen (0h-Gruppe: 111 ± 31 mm⁻² vs. 24h-Gruppe: 123 ± 24 mm⁻²).

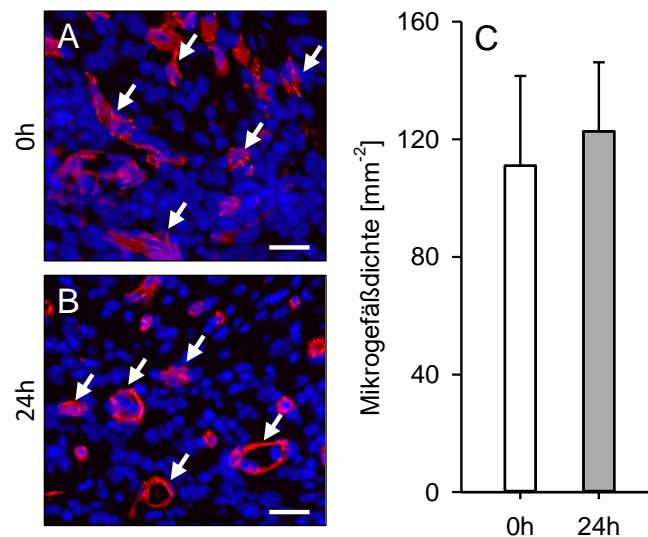


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von CD31⁺ Gefäßen frisch isolierter und 24h-präkultivierter Endometriumfragmente von C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP) 1Osb/J-Mäusen in der Rückenhaulammer von C57BL/6-Mäusen an Tag 14 nach Transplantation. Die Färbung erfolgte mit Hoechst 33342 zur Identifizierung der Zellkerne (blau) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen (rot). Die CD31⁺ Gefäße sind durch Pfeile markiert. Maßstab: 20 µm. **C:** Mikrogefäßdichte (in mm⁻²) der frisch isolierten (0h, weiße Säule, n = 6) und 24h-präkultivierten Endometriumfragmente (graue Säule, n = 7). Mittelwert ± SEM.

7 DISKUSSION

7.1 Diskussion der Methoden

In den letzten Jahren wurden zur Analyse pathogenetischer Mechanismen der Endometriose verschiedene tierexperimentelle Modelle eingesetzt. Die Beantwortung humanmedizinischer Fragestellungen mit Hilfe experimenteller Modelle gelingt umso besser, je näher die Tiergattung mit dem Menschen verwandt ist (SCHAPER und WINKLER, 1998). Speziell Primatenmodelle entsprechen dem Menschen im Bezug auf Physiologie, reproduktive Anatomie und in der spontanen Entstehung einer Endometriose am besten. Ein wesentlicher Vorteil ist auch der Zugang zum Cavum uteri durch die Cervix zur Entnahme von Endometrium, ohne dass eine Hysterektomie erfolgen muss. Die Forschung an nicht-humanen Primaten hat jedoch beträchtliche Limitationen. Zum einen erfordert eine solche Forschung eine spezielle und kostenintensive Infrastruktur und Logistik. Zum anderen sind das Training und der Umgang mit den Tieren sehr zeitaufwendig. Insbesondere in Europa werden die Modelle an nicht-humanen Primaten, wie Pavian und Rhesusaffe, kontrovers diskutiert und von vielen Autoren ethisch nicht akzeptiert (D'HOOGHE et al., 2009).

Vergleichende Genomuntersuchungen kommen zum Ergebnis, dass alle Spezies, mit Ausnahme von Primaten, im Verwandtschaftsgrad ähnlich weit vom Menschen entfernt sind (SCHAPER und WINKLER, 1998). Daher werden in der Endometrioseforschung auch genetisch gut definierte Nagetiermodelle eingesetzt. Diese sind zur Erforschung der komplexen molekularen und zellulären Mechanismen, die zur Endometriose führen, hilfreich (LASCHKE und MENGER, 2012). Mausmodelle haben den großen Vorteil, dass die Maus unter allen Tieren genetisch am besten definiert ist, und zudem die Möglichkeit der genetischen Manipulation besteht (SCHAPER und WINKLER, 1998). Nachteile der Mausmodelle liegen im Bereich der reproduktiven Anatomie und Physiologie, d.h. in der geringen Organgröße sowie dem Ausbleiben einer Menstruation und somit der fehlenden Möglichkeit der Entwicklung einer spontanen Endometriose.

Endometrioseähnliche Herde werden im Nagetiermodell durch Transplantation endometrialer Gewebefragmente erzeugt (GRÜMMER, 2006). Die Transplantation kann von einem Tier in ein anderes Tier mit identischem Genotyp (syngen) oder in dem-

selben Tier (autolog), z.B. vom Uterus zum Peritoneum, erfolgen (BACCI et al., 2009; FAINARU et al., 2008). Beide Methoden haben mögliche verfahrenstypische Einflüsse auf die Entwicklung von Endometrioseherden. Im Falle der syngenen Transplantation können Unterschiede der individuellen Östrogenspiegel verschiedener Mäuse das Wachstum der Herde beeinflussen. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zum Ausschluss hormoneller Schwankungen nur Mäuse als Empfänger und Spender verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Entnahme der Uterus- und Endometriumfragmente und zum Transplantationszeitpunkt im Stadium des Östrus befanden. Die Zyklusbestimmung erfolgte dabei mittels Vaginalzytologie. Im autologen Modell kann die Resektion eines Uterushorns zu chirurgisch induzierten Entzündungsreaktionen mit daraus resultierenden Veränderungen des peritonealen Milieus und zu Verwachsungen im Bauchraum führen. Dies könnte die Implantation und das Wachstum der Endometrioseherde beeinflussen. In einer Untersuchung von KÖRBEL et al. (2010) zeigte sich jedoch, dass die Methode der Transplantation (syngen vs. autolog) keinen signifikanten Einfluss auf das Anwachsen und die Entwicklung von Endometrioseherden hat.

Der Zielort der Transplantation der Uterusfragmente war in der vorliegenden Arbeit das Peritoneum. Die Entwicklung von Endometrioseherden auf dem Peritoneum der vorderen Bauchwand kann mittels hochauflösender Ultraschallbildgebung beurteilt werden (LASCHKE et al., 2010a). Diese quantitative Analyse erfasst das Volumen, den Stromaanteil und die zystischen Anteile der Herde. Am Tag der Explantation kann zusätzlich die Oberfläche der Endometrioseherde als Parameter zur Größemessung mittels Schieblehre ermittelt werden. Nach histologischer und immunhistochemischer Aufarbeitung des Gewebes erfolgt die Auswertung u.a. der Mikrogefäßdichte (LASCHKE et al., 2010b). Auf diese Weise konnten in der vorliegenden Arbeit detaillierte Aussagen zum Wachstumsverhalten und zur Durchblutung der Endometrioseherde gemacht werden.

In einem xenogenen Modell kann isoliertes eutopes oder dystopes endometriales menschliches Gewebe auf Mäuse mit schwerem kombiniertem Immundefekt (SCID Mäuse) oder auch auf Nacktmäuse transplantiert werden (AWWAD et al., 1999; BRUNER et al., 1997). Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, dass man in diesem Modell therapeutische Effekte auf das menschliche Gewebe untersuchen kann. Da die Empfängertiere jedoch kein Immunsystem besitzen, kommt es nicht zu immunologischen Reaktionen zwischen Transplantat und Empfänger, was in vorliegender Arbeit aber

näher untersucht werden sollte. Denn gerade diese immunologischen Prozesse führen zu Adhäsion, Invasion, Proliferation und Angiogenese der Endometrioseherde (WU et al., 2015) und sind somit essentielle Faktoren, die bei der Pathogenese der Endometriose eine Rolle spielen.

Speziell zur Untersuchung von angiogenen Mechanismen ist die Transplantation von Gewebe auf die Chorionallantoismembran von befruchteten Hühnereiern eine häufig angewandte Methode, die seit mehr als 50 Jahren eingesetzt wird (LASCHKE und MENGER, 2007). Die Membran ist mit einem dichten mikrovaskulären Netz ausgestattet und fungiert, ähnlich wie eine Lunge, als Oberfläche zum Gasaustausch. Die Limitationen des Modells liegen in der Schwierigkeit einer nativen Epiluminationsmikroskopie und in einer zeitlichen Begrenzung der Untersuchungsmöglichkeit auf etwa 10 Tage (LASCHKE und MENGER, 2007). Zudem ist die Unversehrtheit des Gewebes eine wesentliche Voraussetzung für die Implantation auf die Membran. Da der frühe Hühnchenembryo noch kein vollständiges Immunsystem besitzt, können immunologische Prozesse, die mitunter bei der Entstehung der Endometriose eine Rolle spielen, in diesem Modell nicht untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Angiogenese in Endometrioseherden bietet das Modell der Rückenhautkammer der Maus. Hierbei können Endometriumfragmente nach Transplantation in die Rückenhautkammer über einen längeren Zeitraum (2 - 3 Wochen) repetitiv mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, um deren Revaskularisierung und Mikrohämodynamik quantitativ zu erfassen (FENG et al., 2014). Neben der Möglichkeit, eine Vielzahl von Parametern erheben zu können, liegt der Vorteil der Rückenhautkammer auch darin, dass durch die repetitive Untersuchung der sich entwickelnden Endometrioseherde eine geringere Anzahl an Versuchstieren benötigt wird. Eine Limitation der Rückenhautkammer ist allerdings, dass es sich bei der Lokalisation der induzierten Endometrioseherde nicht um die typische Lokalisation einer Endometriose, nämlich den Bauchraum, handelt (FENG et al., 2014). Deshalb werden die immunologischen Interaktionen zwischen Endometrium und Peritoneum, die einen Einfluss auf die Entstehung einer Endometriose haben könnten, nicht exakt wiedergespiegelt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedenen Endometriosemodelle kombiniert, um die Aussagekraft der Untersuchungen zu verbessern.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Endometriose ist eine benigne Erkrankung, bei der Endometrioseherde unter anderem auf dem Peritoneum entstehen. Schlüsselprozess in der Pathogenese der Endometriose ist die retrograde Menstruation (SAMPSON, 1927; PERSOONS et al., 2020). 76-90 % aller Frauen haben eine retrograde Menstruation (HALME et al., 1984), jedoch nur 2-25 % entwickeln eine Endometriose (MOGHISSI 1999; OLIVE und PRITT, 2001; GIUDICE und KAO, 2004).

Während der Transitphase auf dem Weg vom Uterus über die Tube in die Peritonealhöhle sind die abgestoßenen Endometriumfragmente nicht perfundiert und damit hypoxischem Stress ausgesetzt, sodass die Integrität des Gewebes und seine Überlebensfähigkeit negativ beeinflusst werden. Dadurch wird auch die angiogene und proliferative Aktivität beeinflusst. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass dieses ischämische Zeitfenster entscheidend ist für die Fähigkeit eines Endometriumfragments, sich zu einem Endometrioseherd zu entwickeln.

Um die Transitzeit eines Endometriumfragments unter avaskulären Bedingungen zu simulieren, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Präkultivierung von Uterus- bzw. Endometriumfragmenten. Die Präkultivierung sollte in den Gewebefragmenten in Folge der niedrigen Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium zumindest in zentralen Gewebeanteilen eine Hypoxie mit ihren komplexen Folgen verursachen. Hierzu wurden die Endometrium- bzw. Uterusfragmente bei 37°C für 24h oder 72h in Standardzellkulturmedium in einer befeuchteten Atmosphäre und 5% CO₂ präkultiviert. Nach dem Daltonschen Gesetz (DALTON, 1805) sollte der Sauerstoffpartialdruck über dem Kulturmedium unter atmosphärischen Bedingungen (20 % Sauerstoff und 750 mmHg Luftdruck) 150 mmHg betragen, was einer Sauerstoffkonzentration von 0,18 – 0,19 mM entspricht. Die Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium ist proportional dem Partialdruck über dem Medium und der Henry-Konstante (HENRY, 1803), die die Löslichkeit von Gasen in definierten Flüssigkeiten charakterisiert. Daraus ergibt sich, dass die Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium lediglich etwa 1/40 der Konzentration in der Luft beträgt (PLACE et al., 2017). Sie ist darüber hinaus noch von anderen Faktoren wie z.B. der Art und Menge des Kulturmediums, der Temperatur, der Anzahl und der Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen abhängig (SHETA et al., 2001). Tatsächlich ist die physiologische Sauerstoffkonzentration im weiblichen Fort-

pflanzungstrakt und in der Peritonealhöhle ebenfalls viel niedriger als unter atmosphärischen Bedingungen (TAN et al., 2014). Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass die Kultivierung von Gewebefragmenten eine Organkultur ist. Diese unterscheidet sich von der Zellkultur dadurch, dass die räumliche Struktur und die Dimension der Gewebefragmente den Gasaustausch behindern (SCHAEFFER, 1990), so dass zumindest im Innern des Gewebes eine chronische Hypoxie herrscht. Diese Vorstellung wurde in einem Organkulturmodell mit pulmonalarteriellen Gewebe bestätigt, in dem auch durch ein Anheben des Sauerstoffpartialdruckes auf 60 % typische Hypoxie-bedingte Veränderungen im kultivierten Gewebe nachgewiesen werden konnten (MANOURY et al., 2009).

Der Ansatz der vorliegenden Arbeit sollte jedoch nicht als Versuch interpretiert werden, die in vivo Situation einer retrograden Menstruation bei Frauen exakt nachzuahmen, sondern eher den Einfluss einer avaskulären Phase auf Endometriumgewebe unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen.

Die Veränderungen in Uterusfragmenten als Folge einer Präkultivierung wurden in einem ersten Studienabschnitt untersucht. Insgesamt veränderte sich die physiologische Morphologie der Uterusfragmente mit der Zeitspanne der Präkultivierung. Die Zelldichten der 24h-präkultivierten und die der frisch isolierten Uterusfragmente unterschieden sich nicht signifikant. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, da eine intakte Gewebeintegrität als essentielle Voraussetzung für die Entstehung eines Endometrioseherdes in verschiedenen Endometriosemodellen gilt (BRUNER et al., 1997; NAP et al., 2003). Im Gegensatz dazu wiesen die 72h-präkultivierten Uterusfragmente eine signifikant erhöhte Apoptoserate auf, außerdem eine signifikant reduzierte Zell- und Mikrogefäßdichte. Dies deutet darauf hin, dass die Entstehung einer Endometriose nur in einem kritischen Zeitfenster möglich ist, in dem ein abgestoßenes Endometriumfragment erfolgreich in die Peritonealhöhle gelangt und auf dem Peritoneum anwächst. Dieser Prozess könnte durch pathologische Veränderungen der Gebärmutterfunktion, wie die bekannte Hyper- oder Dysperistaltik bei Endometriosepatientinnen gefördert werden (KISSLER et al., 2007; AGUILAR und MITCHELL, 2010).

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit, entwickelten sich signifikant weniger Uterusfragmente, die 24h präkultiviert wurden, zu Endometrioseherden im Vergleich zu frisch isolierten Uterusfragmenten. Andererseits zeigten die Endometrioseherde, die sich aus den 24h-präkultivierten Uterusfragmenten entwickelten, wäh-

rend des 28-tägigen Untersuchungszeitraums ein wesentlich aggressiveres Wachstum, was sich in den Ultraschallanalysen durch ein deutlich größeres Gesamt- und Stromavolumen präsentierte. Diese Beobachtung kann durch die Ergebnisse des durchgeführten Proteome-Profiler-Mouse-Angiogenese-Arrays erklärt werden. In diesem Array wurde die Expression von 53 Angiogenese-relevanten Proteinen untersucht. Vierzehn Proteine in der Gruppe der 24h- und 72h-präkultivierten Uterusfragmente waren 4-20-fach und weitere 14 Proteine 2-3-fach überexprimiert im Vergleich zu den frischen und nicht präkultivierten Fragmenten. Diese Überexpression ist höchstwahrscheinlich auf Hypoxie-induzierte Signalwege zurückzuführen, z.B. wie den Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF)1- α /Cyr61-Signalweg (ZHAO et al., 2014; GASHAW et al., 2008). Die höchste Expression nach 24h Präkultivierung erreichte dabei Cyr61 und nach 72h Präkultivierung KC. Dementsprechend könnte die Aktivität dieser Faktoren die angiogene Aktivität des Gewebes deutlich erhöht haben. Zudem zeigte sich eine Hochregulierung der MMP-3. MMPs sind proteolytische Enzyme, die von Endometriumfragmenten für den Abbau und die Umgestaltung der extrazellulären Matrix sezerniert werden, um eine Invasion in umliegendes Gewebe zu ermöglichen (LAGANÁ et al., 2019). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass eine veränderte Expression von MMPs in eutopem und ektopem Endometrium zur Pathogenese der Endometriose beiträgt (CHUNG et al., 2001; RAMÓN et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass MMP-3 durch IL-1 hochreguliert wird, welches ebenfalls in den präkultivierten Uterusfragmenten überexprimiert war (SILLEM et al., 2001).

Die Endometriose wird auch als entzündliche Erkrankung angesehen (RICCIO et al., 2018). So werden bei allen Typen der Erkrankung Endometriose-assoziierte Immunzellinfiltrate beschrieben. Die ausgeprägtesten Infiltrate sind bei der peritonealen und ovariellen Endometriose nachweisbar (SCHEERER et al., 2016). Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine Analyse der Immunzellinfiltration in den sich entwickelnden Endometrioseherden. Hierbei wurden viele T-Lymphozyten detektiert. Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Herden aus frisch isolierten und 24h-präkultivierten Uterusfragmenten erkennen. Die Anzahl der CD68-positiven Makrophagen war in den Endometrioseherden, die sich aus frisch isolierten Uterusfragmenten entwickelten, signifikant höher als in den Endometrioseherden der 24h-präkultivierten Gruppe. In gleicher Weise war auch die Anzahl MPO-positiver neutrophiler Granulozyten signifikant erhöht. Letztendlich ist nicht klar, ob diese Immunzellen aus dem Transplantat (Uterusfragment) oder dem Peritoneum

des Empfängers stammen. Makrophagen werden wesentlich für die Entwicklung von Endometrioseherden verantwortlich gemacht (WILSON, 2018). Ihre Aktivierung zu einem reparativen Phänotyp (alternative Aktivierung) fördert das Überleben, die Vaskularisierung und das Wachstum der Herde (CAPOBIANCO und ROVERE-QUERINI, 2013; BACCI et al., 2009, SPÄTER et al., 2020). Daher wäre auf Grundlage der vorliegenden Ultraschallanalysen eine höhere Anzahl dieser Immunzellen in den Endometrioseherden, welche sich aus 24h-präkultivierten Uterusfragmenten entwickelten, zu erwarten gewesen. Möglicherweise förderte die Präkultivierung jedoch die Umwandlung von pro-inflammatorischen M1- zu pro-angiogenen und regenerativen M2-Makrophagen, welche die Entwicklung der Herde trotz insgesamt niedrigeren Gesamtzahl stimuliert haben könnte.

Weitere immunhistochemische Analysen ergaben, dass in Endometrioseherden, die sich aus frisch isolierten oder 24h-präkultivierten Uterusfragmenten entwickelten, die Endothelzellen in 70 - 74 % ein GFP-positives Signal aufwiesen. Dies bedeutet, dass nur 26 - 30 % der nachgewiesenen Gefäße aus dem umliegenden Empfängergewebe stammen, während in beiden Gruppen die meisten Mikrogefäße den Prozess der Transplantation überlebten. Entsprechend kann geschlussfolgert werden, dass der primäre Vaskularisierungsmodus im vorliegenden Endometriosemodell eine Inoskulation war. Inoskulation bedeutet die Verbindung von Blutgefäßen. Dabei können einerseits Gefäße aus dem Transplantat aussprossen und sich außerhalb (extern) mit Empfängergefäßen verbinden. Andererseits können auch Empfängergefäße in das Transplantat einsprossen und innerhalb des Transplantates (intern) eine Verbindung eingehen. Beide Varianten, interne und externe Inoskulation, sind in Endometriosemodellen beschrieben (LASCHKE et al., 2010b; MACHADO et al., 2014; FENG et al., 2014). Die Hypoxie-induzierte Überexpression von pro-angiogenen Faktoren könnte die Einsprossung von Gefäßen in die 24h-präkultivierten Uterusfragmente begünstigt haben. Entsprechend zeigte sich im Modell der Rückenhautkammer auch eine verbesserte Vaskularisierung in den 24h-präkultivierten Endometriumfragmenten, die im Vergleich zu frisch isolierten Fragmenten eine höhere funktionelle Kapillardichte aufwiesen. Eine solche verbesserte Vaskularisierung könnte auch zur erhöhten Wachstumsrate der Transplantate in der Peritonealhöhle beigetragen haben. Nicht nur Angiogenese wird durch Hypoxie stimuliert, sondern auch die Zellproliferation (HARRIS, 2002). Dies könnte ebenfalls das höhere Gesamt- und Stromavolumen der Herde der 24h-präkultivierten Uterusfragmente erklären (HARRIS, 2002).

7.3 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Ischämie einen wesentlichen Einfluss auf die Gewebeintegrität von Uterus- bzw. Endometriumfragmenten hat. Überschreitet die avaskuläre hypoxische Phase einen bestimmten Zeitraum, ist die Entwicklung eines Endometrioseherdes aus einem Endometriumfragment nicht mehr möglich. Andererseits induziert Hypoxie die Angiogenese und gleichzeitig die Zellproliferation, was zur Ausbildung deutlich aggressiverer Herde führen kann. Damit repräsentiert die Dauer des Ischämie-Zeitfensters für abgestoßene Endometriumschleimhaut einen wichtigen Selektionsfaktor, der die Entwicklung eines Endometrioseherdes in der Peritonealhöhle und damit das Risiko, an einer Endometriose zu erkranken, bestimmt.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abrao MS, Goncalves MO, Dias JA Jr, Podagaec S, Chamie LP, Blasbalg R (2007)** Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod* 22:3092-3097
2. **Aguilar HN, Mitchell BF (2010)** Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 16:725-744
3. **Albrecht H (1955)** Die Endometriose. In: Seitz L, Amreich AI (eds): *Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. IV.* Urban & Schwarzenberg, Berlin-Innsbruck-München-Wien
4. **Alborzi S, Hamed B, Omidvar A, Dehbashi S, Alborzi S, Alborzi M (2011)** A comparison of the effect of short-term aromatase inhibitor (letrozole) and GnRH agonist (triptorelin) versus case control on pregnancy rate and symptom and sign recurrence after laparoscopic treatment of endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 284:105-110
5. **Al-Talib A, Tulandi T (2010)** Intestinal endometriosis. *Gynecol Surg* 7:61-62
6. **American Society for Reproductive Medicine (1997)** Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis. *Fertil Steril* 67:817-822
7. **Arslan A, Almazan G, Zingg HH (1994)** Characterization and co-culture of novel nontransformed cell lines derived from rat endometrial epithelium and stroma. *Cell Dev Biol* 31:140-148
8. **Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST, Isaacson K (1999)** The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Hum Reprod* 14:3107-3111
9. **Bacci M, Capobianco A, Monno A, Cottone L, Di Puppò F, Camisa B, Mariani M, Brignole C, Ponzoni M, Ferrari S, Panina-Bordignon P, Manfredi AA, Rovere-Querini P (2009)** Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* 175:547-556

10. **Barbieri RL (1998)** Endometriosis and the estrogen threshold theory. Relation to surgical and medical treatment. *J Reprod Med* 43:287-292
11. **Bazot M, Lafont C, Rouzier R, Roseau G, Thomassin-Naggara I, Darai E (2009)** Diagnostic accuracy of physical examination, transvaginal sonography, rectal endoscopic sonography, and magnetic resonance imaging to diagnose deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 92:1825-1833
12. **Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ (2008)** 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1{alpha} and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 172:534-544
13. **Bektas H, Bilsel Y, Sari YS, Ersöz F, Koc O, Deniz M, Boran B, Huq GE (2010)** Abdominal wall endometrioma: a 10-year experience and brief review of the literature. *J Surg Res* 164:e77-81
14. **Benagiano G, Brosens I, Lippi D (2014)** The history of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 78:1-9
15. **Blumenkrantz MJ, Gallagher N, Bashore RA, Tenckhoff H (1981)** Retrograde menstruation in women undergoing chronic peritoneal dialysis. *Obstet Gynecol* 57:667-670
16. **Bouras AF, Vincentelli A, Boleslawski E, Truant S, Liddo G, Prat A, Pruvot FR, Zerbib P (2013)** Liver endometriosis presenting as a liver mass associated with high blood levels of tumoral biomarkers. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 37:e85-88
17. **Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A, Olovsson M (2006)** The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction* 132:1686-1690
18. **Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein E, Osteen KG (1997)** Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 99:2851-2857
19. **Bulletti C, de Ziegler D (2006)** Uterine contractility and embryo implantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18:473-484

20. **Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012)** Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS One* 7:e35538
21. **Bulun SE (2009)** Endometriosis. *N Engl J Med* 360:268-279
22. **Capobianco A, Rovere-Querini P (2013)** Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front Immunol* 4:9
23. **Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH (1970)** Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2:67-76
24. **Ceccaroni M, Clarizia R, Placci A (2010)** Pericardial, pleural, and diaphragmatic endometriosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140:1189-1190
25. **Chan RWS, Lee CL, Ng EHY, Yeung WSB (2017)** Co-culture with macrophages enhances the clonogenic and invasion activity of endometriotic stromal cells. *Cell Prolif* 50:e12330
26. **Chistiakow DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekho AN, Bobryshev YV (2017)** CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97:4-13
27. **Chopin N, Vieira M, Borghese B, Foulot H, Dousset B, Coste J, Mignon A, Fauconnier A, Chapron C (2005)** Operative management of deeply infiltrating endometriosis: results on pelvic pain symptoms according to a surgical classification. *J Min Invas Gynecol* 12:106-112
28. **Chung HW, Wen Y, Chun SH, Nezhat C, Woo BH, Lake Polan M (2001)** Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 mRNA expression in ectopic and eutopic endometrium in women with endometriosis: a rationale for endometriotic invasiveness. *Fertil Steril* 75:152-159
29. **Claas-Quax MJ, Ooft ML, Hoogwater FJ, Veersama S (2015)** Primary umbilical endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 194:260-261
30. **Cullen TS (1920)** The distribution of adenomyomas containing uterine mucosa. *Arch Surg* 1:215-283
31. **Dalton J (1801)** Eine neue Theorie über die Beschaffenheit gemischter luftförmiger Flüssigkeiten, besonders der atmosphärischen Luft. *Nicholsons Journal* 5:241

32. **D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, Dunselman GA, Evers HL, Koninckx PR (1994)** Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 62:635-638
33. **D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, de Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR (1995)** Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am J Obstet Gynecol* 173:125-134
34. **D'Hooghe TM, Kyama CM, Chai D, Fassbender A, Vodolazkaia A, Bokor A, Mwenda JM (2009)** Nonhuman primate models for translational research in endometriosis. *Reprod Sci* 16:152-161
35. **Endrich B, Goetz A, Messmer K (1982)** Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma. *Int J Microcirc Clin Exp* 1:81-99
36. **Fainaru O, Adini A, Benny O, Adini I, Short S, Bazinet L, Nakai K, Pravda E, Hornstein MD, D'Amato RJ Folkman J (2008)** Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J* 22:522-529
37. **Falconer H, Mwenda JM, Chai DC, Wagner C, Song XY, Mihalyi A, Simsa P, Kyama C, Cornillie FJ, Bergqvist A, Fried G, D'Hooghe TM (2006)** Treatment with anti-TNF monoclonal antibody (c5N) reduces the extent of induced endometriosis in the baboon. *Hum Reprod* 21:1856-1862
38. **Fauconnier A, Chapron C, Dubuisson JB, Vieira M, Dousset B, Breart G (2002)** Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 78:719-726
39. **Feng D, Menger MD, Wang H, Laschke MW (2014)** Luminal epithelium in endometrial fragments affects their vascularization, growth and morphological development into endometriosis-like lesions in mice. *Dis Model Mech* 7:225-232
40. **Fuji S (1991)** Secondary Müllerian system and endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 165:219-225
41. **Garcia L, Isaacson K (2011)** Adenomyosis: review of the literature. *J Min Invas Gynecol* 18:428-437

-
42. **Garry R (2004)** The effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 16:299-303
 43. **Gashaw I, Stiller S, Böing C, Kimmig R, Winterhager E (2008)** Premenstrual regulation of the pro-angiogenic factor CYR 61 in human endometrium. *Endocrinology* 149:2261-2269
 44. **Giannarini G, Scott GA, Moro U, Grossetti B, Pomara G, Selli C (2006)** Cystic endometriosis of the epididymis. *Urology* 68:203.e1-3
 45. **Gilabert-Estelles J, Estelles A, Gilabert J, Castello R, Espana F, Falco C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J (2003)** Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 18:1516-1522
 46. **Giudice LC, Kao LC (2004)** Endometriosis. *Lancet* 364:1789-1799
 47. **Giudice LC (2010)** Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 362:2389-2398
 48. **Grossman Barr N (2010)** Managing adverse effects of hormonal contraceptives. *Am Fam Physician* 82:1499-1506
 49. **Grümmer R, Schwarzer F, Bainzyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E (2001)** Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 16:1736-1743
 50. **Grümmer R (2006)** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12:641-649
 51. **Gruppo Italiano per lo Studio dell' Endometriosi (2001)** Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* 16:2668-2671
 52. **Guo SW (2020)** The pathogenesis of adenomyosis vis-à-vis endometriosis. *J Clin Med* 9:485
 53. **Gustofson RL, Kim N, Liu S, Stratton P (2006)** Endometriosis and the appendix: a case series and comprehensive review of the literature. *Fertil Steril* 86:298-303

54. **Guzick DS, Silliman NP, Adamson GD, Buttram VC Jr, Canis M, Malinak LR, Schenken RS (1997)** Prediction of pregnancy in infertile women based on the American Society for Reproductive Medicine's revised classification of endometriosis. *Fertil Steril* 67:822-829
55. **Guzick DS, Huang LS, Broadman EA, Nealon M, Hornstein MD (2011)** Randomized trial of leuprolide versus continuous oral contraceptives in the treatment of endometriosis-associated pelvic pain. *Fertil Steril* 95:1568-1573
56. **Haas D, Chvatal R, Reichert B, Renner S, Shebl O, Binder H, Wurm P, Oppelt P (2012)** Endometriosis - a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 286:667-670
57. **Haas D, Shell O, Shamiyeh A, Oppelt P (2013)** The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scan* 92:3-7
58. **Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM (1984)** Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64:151-154
59. **Harris AL (2002)** Hypoxia- a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47
60. **Hudelist G, Oberwinkler KH, Singer CF, Tuttlies F, Rauter G, Ritter G, Keckstein J (2009)** Combination of transvaginal sonography and clinical examination for preoperative diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 24:1018-1024
61. **Hudelist G, Fritzer N, Thomas A, Niehues C, Oppelt P, Haas D, Tammaa A, Salzer H (2012)** Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. *Hum Reprod* 27:3412-3416
62. **Hur SE, Lee JY, Moon HS, Chung HW (2006)** Angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie-2 expression in eutopic endometrium in advanced endometriosis. *Mol Hum Reprod* 12:421-426
63. **Jacobson TZ, Duffy JMN, Barlow D, Koninckx PR, Garry R (2009)** Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 7:CD001300

-
64. **Jubanyik KJ, Comite F (1997)** Extrapelvic endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 24:411-440
 65. **Kang S, Zhao J, Liu Q, Zhou R, Wang N, Li Y (2009)** Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with the risk of developing adenomyosis. *Environ Mol Mutagen* 50:361-366
 66. **Kido A, Togashi K, Nishino M, Miyake K, Koyama T, Fujimoto R, Iwasaku K, Fujii, S, Hayakawa K (2007)** Cine MR imaging of uterine peristalsis in patients with endometriosis. *Eur Radiol* 17:1813-1819
 67. **Kissler S, Zangos S, Wiegatz I, Kohl J, Rody A, Gaetje R, Doebert N, Wildt L, Kunz G, Leyendecker G (2007)** Utero-tubal sperm transport and its impairment in endometriosis and adenomyosis. *Ann N Y Acad Sci* 1101:38-48
 68. **Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH (1998)** Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4:741-751
 69. **Körbel C, Menger MD, Laschke MW (2010)** Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. *Hum Reprod* 25:2551-2558
 70. **van der Kuip H, Mürdter TE, Sonnenberg M, McClellan M, Gutzeit S, Ger-teis A, Simon W, Fritz P, Aulitzky WE (2006)** Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC Cancer* 6:86
 71. **Kunz G, Herbertz M, Beil D, Huppert G, Leyendecker G (2007)** Adenomyosis as a disorder of the early and late human reproductive period. *Reprod Biomed Online* 15:681-685
 72. **Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM (2003)** Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 1:123
 73. **Laganà AS, Garzon S, Götte M, Viganò P, Franchi M, Ghezzi F, Martin DC (2019)** The pathogenesis of endometriosis: molecular and cell biology insights. *Int J Mol Sci* 20:5615
 74. **Lang G (2006)** Zellkultur. In *Histotechnik*, Springer-Verlag, Wien, 319-332

75. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Menger MD (2005)** In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 84:1199-1209
76. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD (2007)** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by downregulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87:163-171
77. **Laschke MW, Menger MD (2007)** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 13:331-342
78. **Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD (2010a)** High-resolution ultrasound imaging. A novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol* 176:585-593
79. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD (2010b)** Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater* 20:356-366
80. **Laschke MW, Menger MD (2012)** Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 18:682-702
81. **Laschke MW, Menger MD (2018)** Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update* 24:207-224
82. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993)** Dorsal skin-fold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062
83. **Leyendecker G, Kunz G, Wildt L, Beil D, Deininger H (1996)** Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod* 11:1542-1551

84. **Leyendecker G, Wildt L, Mall G (2009)** The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 280:529-538
85. **Leyendecker G, Bilgicyildirim A, Inacker M, Stalf T, Huppert P, Mall G, Böttcher B, Wildt L (2015)** Adenomyosis and endometriosis. Re-visiting their association and further insights into the mechanisms of auto-traumatisation. An MRI study. *Arch Gynecol Obstet* 291:917-932
86. **Liu DTY, Hitchcock A (1986)** Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhöa and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 93:859-862
87. **Machado DE, Palumbo A Jr, Santos JM, Mattos RM, Dos Santos TA, Seabra SH, Boldrini Lda C, Perini JA, Nasciutti LE (2014)** A GFP endometriosis model reveals important morphological characteristics of the angiogenic process that govern benign and malignant diseases. *Histol Histopathol* 29:903-912
88. **Manoury B, Etheridge SL, Reid J, Gurney AM (2009)** Organ culture mimics the effects of hypoxia on membrane potential, K(+) channels and vessel tone in pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 158:848-861
89. **Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, Itoh R, Iwaguro H, Eguchi M, Iwami Y, Tanaka R, Nakagawa Y, Sugimoto A, Ninomiya S, Hayashi S, Kato S, Asahara T (2007)** Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res* 101:598-606
90. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002)** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34:83-91
91. **Mettler L (1995)** Inzidenz, Progredienz und Problematik einer Klassifikation der Endometriose. *Frauenarzt* 36:334-338
92. **Meuleman C, Tomassetti C, D'Hooghe TM (2012)** Clinical outcome after laparoscopic radical excision of endometriosis and laparoscopic segmental bowel resection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 24:245-252

93. **Meyer R (1919)** Über den Stand der Frage der Adenomyositis, Adenomyome im Allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynäkol* 36:745-750
94. **Missmer SA, Cramer DW (2003)** The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin N Am* 30:1-19
95. **Minjarez DA, Schlaff WD (2000)** Update on the medical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 27:641-651
96. **Moghissi KS (1999)** Medical treatment of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* 42:620-632
97. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Maas JW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL (2003)** Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 18:30-34
98. **Nothnick WB, Colvin A, Cheng KF, Al-Abed Y (2011)** Inhibition of macrophage migration inhibitory factor reduces endometriotic implant size in mice with experimentally induced disease. *J Endometr* 3:135-142
99. **Nothnick W, Alali Z (2016)** Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. *Faculty Rev* 186:10.12688
100. **Novak E, de Lima OA (1948)** A correlative study of adenomyosis and pelvic endometriosis, with special reference to the hormonal reaction of ectopic endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 56:634-644
101. **Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997)** Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313-319
102. **Olive DL, Pritts EA (2001)** Treatment of endometriosis. *N Engl J Med* 345:266-275
103. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR (1992)** The natural killer activity of peritoneal fluid lymphocytes is decreased in women with endometriosis. *Fertil Steril* 58:290-295
104. **Overton C, Davis C, McMillan L, Shaw RW, Koh C (2007)** An atlas of endometriosis. 3rd edition Informa Healthcare, London

105. **Ozel L, Sagiroglu J, Unal A, Unal E, Gunes P, Baskent E, Aka N, Titiz Mi, Tufekci EC (2012)** Abominal wall endometriosis in the cesarean section surgical scar: a potential diagnostic pitfall. *J Obstet Gynaecol Res* 38:526-630
106. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA (1979)** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18:311-318
107. **Persoons E, De Clercq K, Van den Eynde C, Pinho SJPC, Luyten K, Va Bree R, Tomassetti C, Voets T, Vriens J (2020)** Mimicking Sampson's retrograde menstrual theory in rats: a new rat model for ongoing endometriosis-associated pain. *Int J Mol Sci* 21:2326
108. **Pierro E, Minici F, Alesiani O, Miceli F, Proto C, Screpanti I, Mancuso S, Lanzone A (2001)** Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium. *Biol Reprod* 64:831-838
109. **Pinkus GS, Pinkus JL (1991)** Myeloperoxidase: a specific marker for myeloid cells in paraffin sections. *Mod Pathol* 6:733-741
110. **Place TL, Domann FE, Case AJ (2017)** Limitations of oxygen delivery to cells in culture: an underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med* 113:311-322
111. **Porter AG, Jänicke RU (1999)** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:99-104
112. **Possover M (2009)** Laparoscopic management of neural pelvic pain in women secondary to pelvic surgery. *Fertil Steril* 91:2720-2725
113. **Ramón L, Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, España F, Romeu A, Chirivella M, Aznar J, Estellés A (2005)** mRNA analysis of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Hum Reprod* 20:272-278
114. **Redwine DB (2002)** Diaphragmatic endometriosis: diagnosis, surgical management, and long-term results of treatment. *Fertil Steril* 77:288-296
115. **Riccio LDGC, Santulli P, Marcellin L, Abrao MS, Batteux F, Chapron C (2018)** Immunology of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 50:39-49

116. **Rinehart JCA, Lyn-Cook BD, Kaufmann DG (1988)** Gland formation from human endometrial epithelial cells in vitro. *Cell Dev Biol* 24:1037-1041
117. **von Rokitansky C (1860)** Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen. *Ztsch KK Gesellsch der Ärzte zu Wien* 37:577-582
118. **Rodgers AK, Falcone T (2008)** Treatment strategies for endometriosis. *Expert Opin Pharmacother* 9:243-255
119. **Roman H, Ness J, Suciú N, Bridoux V, Gourcerol G, Leroi AM, Tuech JJ, Ducrotte P, Savoye-Collet C, Savoye G (2012)** Are digestive symptoms in women presenting with pelvic endometriosis specific to lesion localizations? *Hum Reprod* 27:3440-3449
120. **Russel WW (1899)** Aberrant portions of the Müllerian duct found in an ovary: ovarican cysts of Müllerian origin. *Bull John Hopkins Hospital* 10:8-10
121. **Ryan G (2010)** T cell signalling: CD 3 conformation is crucial for signalling. *Nat Rev Immunol* 10:7
122. **Sampson JA (1927)** Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14:422-469
123. **Sangi-Haghpeykar H, Poindexter III AN (1995)** Epidemiology of endometriosis among parous women. *Obstet Gynecol* 85:983-992
124. **Sasson IE, Taylor HS (2008)** Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1127:106-115
125. **Schaeffer WI (1990)** Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:97-101
126. **Schaper W, Winkler B (1998)** Of mice and men – the future of cardiovascular research in the molecular era. *Cardiovasc Res* 39:3-7
127. **Scheerer C, Bauer P, Chiantera V, Sehouli J, Kaufmann A, Mehnser S (2016)** Characterization of endometriosis-associated immune cell infiltrates (EmalCI). *Arch Gynecol Obstet* 294:657-664

128. **Scholzen T, Gerdes J (2000)** The Ki 67 protein: from the known to the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322
129. **Sharpe-Timms KL, Zimmer RL, Ricke EA, Piva M, Horowitz GM (2002)** Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis. *Fertil Steril* 78:810-819
130. **Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D (2001)** Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene* 20:7624-7634
131. **Siegfried JM, Nelson KG, Martin JL, Kaufmann DG (1984)** Histochemical identification of cultured cells from human endometrium. *In Vitro* 20:25-32
132. **Sillem M, Prifti S, Koch A, Neher M, Jauckus J, Runnebaum B (2001)** Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in uterine endometrial cells of patients with and without endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 95:167-174
133. **Soriano D, Schonman R, Nadu A, Lebovitz O, Schiff E, Seidman DS, Goldenberg M (2011)** Multidisciplinary team approach to management of severe endometriosis affecting the ureter: long-term outcome data and treatment algorithm. *J Minim Invasive Gynecol* 18:483-488
134. **Später T, Menger MM, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW (2020)** Makrophages promote network formation and maturation of transplanted adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Tissue Eng* 11:2041731420911816
135. **Spector DL, Goldman RD (2006)** Basic methods in microscopy. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY
136. **Steinberg JA, Gonda DD, Muller K, Ciacci JD (2014)** Endometriosis of the conus medullaris causing cyclic radiculopathy. *J Neurosurg Spine* 21:799-804
137. **Story L, Kennedy S (2004)** Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 45:132-138

138. **Tan CW, Lee YH, Tan HH, Lau MS, Choolani M, Griffith L, Chan JK (2014)** CD26/DPPIV down-regulation in endometrium stromal cell migration in endometriosis. *Fertil Steril* 102:167-177
139. **Tuttles F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Gerb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinneberg HR (2005)** ENZIAN-score. Eine Klassifikation der tiefen infiltrierenden Endometriose. *Zentralbl Gynäkol* 127:275-281
140. **Ulrich U, Buchweitz O, Gerb R, Kecksten J, von Leffern I, Oppelt P, Renner SP, Sillem M, Stummvoll W, De Wilde RL, Schweppe KW (2014)** National German Guideline (S2k): Guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Geburtshilfe Frauenheilk* 74:1104-1118
141. **Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG (1996)** Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 65:299-304
142. **Vercellini P, Frontino G, DeGiorgi O (2003)** Continuous use of an oral contraceptive for endometriosis-associated recurrent dysmenorrhöa that does not respond to a cyclic pill regimen. *Fertil Steril* 80:560-563
143. **Visouli AN, Darwiche K, Mpakas A, Zarogoulides P, Papagiannis A, Tsakiridis K, Machairiotis N, Stylianaki A, Katsikogiannis N, Courcoutsakis N, Zarogoulidis K (2012)** Catamenial pneumothorax: a rare entity? Report of 5 cases and review of the literature. *J Thorac Dis* 1:17-31
144. **Wang Y, Chen H, Wang NL, Guo HY, Fu Y, Xue S, Ai A, Lyu Q, Kuang Y (2015)** Combined 17 β -estradiol with TCDD promotes M2 polarization of macrophages in the endometriotic milieu with aid of interaction between endometrial stromal cells and macrophages. *Plos One* 10:e0125559
145. **Wilson RB (2018)** Hypoxia, cytokines and stromal recruitment: parallels between pathophysiology of encapsulating peritoneal sclerosis, endometriosis and peritoneal metastasis. *Pleura Peritoneum* 3:20180103
146. **Witz CA, Burns WN (2002)** Endometriosis and infertility: is there a cause and effect relationship? *Gynecol Obstet Invest* 53:2-11

-
147. **Wu MH, Sun HS, Lin CC, Hsiao KY, Chuang PC, Pan HA, Tsai SJ (2002)** Distinct mechanisms regulate cyclooxygenase-1 and -2 in peritoneal macrophages of women with and without endometriosis. *Mol Hum Reprod* 8:1103-1110
148. **Wu MH, Hsiao KY, Tsai SJ (2015)** Endometriosis and possible inflammation markers. *GMIT* 4:61-67
149. **Wu MH, Hsiao KY, Tsai SJ (2019)** Hypoxia: the force of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 45:532-541
150. **Zhao Y, Li Q, Katzenellenbogen BS, Lau LF, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK (2014)** Estrogen-induced CCN1 is critical for establishment of endometriosis-like lesions in mice. *Mol Endocrinol* 28:1934-1947
151. **Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA (2020)** Endometriosis. *N Engl J Med* 382:1244-1256

9 DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei allen, die mich während meiner wissenschaftlichen Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Herrn Prof. Dr. Matthias Laschke danke ich für das Überlassen des Themas, seine stete Unterstützung und konstruktive Kritik. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Jeannette Rudzitis-Auth für die Anleitung in den verschiedenen chirurgischen Techniken sowie dem Durchführen der Experimente und für ihre stete Unterstützung, konstruktive Kritik und Geduld.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre und außerordentliche Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dr. Claudia Scheuer, Frau Julia Parakenings, Frau Janine Becker, Frau Sandra Hans, Frau Caroline Bickelmann und Frau Ruth Nickels, die mir bei den Laboranalysen und der Anfertigung immunhistochemischer Schnitte stets zur Seite standen. Außerdem danke ich Frau Elisabeth Gluding und allen Tierpflegern und Tierpflegerinnen.

Meinen Eltern und meinen Schwestern Esther und Judith, die mich immer unterstützt und motiviert haben, danke ich von ganzem Herzen.

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

10 PUBLIKATION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgender Originalpublikation zusammengefasst:

Rudizitis-Auth J, **Huwer SI**, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW (2022) The ischemic time window of ectopic endometrial tissue crucially determines its ability to develop into endometriotic lesions. *Sci Rep* 12:5625.

Tag der Promotion: 20.12. 2022

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. M. W. Laschke

Prof. Dr. E.- F. Solomayer