

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

**Der Einfluss des Sphingosin-1-Phosphat-Signalweges auf
die Angiogenese und das Wachstum experimentell
induzierter Endometrioseherde**

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

2023

vorgelegt von Anika Christoffel
geb. am 06.09.1988 in Idar-Oberstein

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	Endometriose	5
3.1.1	Definition und Epidemiologie der Endometriose	5
3.1.2	Pathogenese der Endometriose	6
3.1.3	Diagnostik und Therapie der Endometriose	8
3.2	Angiogenese	11
3.2.1	Die physiologische Angiogenese	11
3.2.2	Angiogenese bei der Endometriose	12
3.3	Spingosin-1-Phosphat-Signalweg	13
3.4	Wirkstoffe	16
3.4.1	SKI-5C	16
3.4.2	SEW2871	18
3.4.3	Fingolimod [FTY720]	19
4	ZIELSTELLUNG	22
5	MATERIAL UND METHODEN	23
5.1	Versuchstiere	23
5.2	Vaginale Zyklusbestimmung	23
5.3	Gewinnung von Uterusgewebe	24
5.4	Modell der Rückenhautkammer	25
5.4.1	Präparation der Rückenhautkammer	25
5.4.2	Transplantation der Endometriumfragmente	26
5.4.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	27
5.4.4	Entnahme der Endometriumfragmente, Ovarien und Uteri	29
5.5	Modell der intraperitonealen Endometriose	29
5.5.1	Transplantation der Uterusstanzen	29

5.5.2	Hochauflösende Ultraschall-Bildgebung	30
5.5.3	Messung mit digitalem Messschieber	31
5.5.4	Entnahme der Endometrioseherde, Ovarien und Uteri	31
5.6	Histologie und Immunhistochemie	32
5.6.1	HE-Färbung	32
5.6.2	Ki67-Färbung	32
5.6.3	CD31-Färbung	32
5.7	Experimentelles Protokoll	33
5.7.1	SKI-5C	33
5.7.2	SEW2871	35
5.7.3	FTY720	36
5.7.4	Statistik	36
6	ERGEBNISSE	38
6.1	Einfluss von SKI-5C auf Endometrioseherde	38
6.1.1	Endometrioseherde im Rückenhautkammermodell	38
6.1.1.1	Wachstum und Vaskularisierung der Endometrioseherde	38
6.1.2	Endometrioseherde im intraperitonealen Modell	41
6.1.2.1	Wachstum der Endometrioseherde	41
6.1.2.2	Vaskularisierung der Endometrioseherde	43
6.1.2.3	Zellproliferation in den Endometrioseherden	44
6.1.3	Einfluss von SKI-5C auf die weiblichen Geschlechtsorgane	45
6.2	Einfluss von SEW2871 auf Endometrioseherde	46
6.2.1	Endometrioseherde im Rückenhautkammermodell	46
6.2.1.1	Wachstum und Vaskularisierung der Endometrioseherde	46
6.2.2	Einfluss von SEW2871 auf die weiblichen Geschlechtsorgane	50
6.3	Einfluss von FTY720 auf Endometrioseherde	51
6.3.1	Endometrioseherde im Rückenhautkammermodell	51
6.3.1.1	Wachstum und Vaskularisierung der Endometrioseherde	51
6.3.2	Der Einfluss von FTY720 auf die weiblichen Geschlechtsorgane	55
6.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
7	DISKUSSION	58

7.1 Diskussion von Material und Methoden	58
7.1.1 Endometriosemodelle im Versuchstier.....	58
7.1.2 Untersuchungstechniken	60
7.1.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	60
7.1.2.2 Hochauflösende Ultraschall-Bildgebung.....	61
7.2 Diskussion der Ergebnisse	63
7.2.1 Einfluss der SPHK auf die Endometriose.....	63
7.2.2 SKI-5C	63
7.2.3 SEW2871.....	66
7.2.4 FTY720.....	68
7.3 Schlussfolgerungen.....	71
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	73
9 DANKSAGUNG	91
10 LEBENSLAUF	92
11 PUBLIKATION	93

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Endometriose ist eine häufige gynäkologische Erkrankung, unter der etwa 10-20% aller Frauen im reproduktiven Alter leiden. Sie wird durch das Vorkommen von endometrialem Gewebe außerhalb der Uterushöhle definiert. Zu den typischen Symptomen der Endometriose gehören Dysmenorrhoe, chronische Unterbauchschmerzen, Dyspareunie und Infertilität. Die Ursachen für die Entstehung einer Endometriose sind noch nicht grundlegend geklärt, die Implantationstheorie von Sampson gilt aktuell aber immer noch als am wahrscheinlichsten. Dabei wird davon ausgegangen, dass endometriale Gewebefragmente während der Menstruation retrograd in den Bauchraum einwandern und dort zur Bildung von Endometrioseherden führen. Diese Herde sind abhängig von der Entwicklung neuer Blutgefäße (Angiogenese), die das Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Daher könnten anti-angiogene Behandlungsstrategien, wie sie gegenwärtig bereits in der Onkologie eingesetzt werden, auch bei der Bekämpfung der Endometriose wirksam sein. Hierfür könnte der Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg einen möglichen Ansatzpunkt darstellen. Der Haupteffektor dieses Signalweges ist Sphingosin-1-Phosphat, das intrazellulär von der Sphingosinkinase 1 und 2 gebildet wird. Sphingosin-1-Phosphat bindet extrazellulär an Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und kann so die Proliferation und Reifung von Blutgefäßen stimulieren. Basierend auf dieser Erkenntnis war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, erstmalig den Einfluss der potentiell anti-angiogenen Wirkstoffe SKI-5C, SEW2871 und FTY720, die in den Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg eingreifen, auf die Entwicklung induzierter Endometrioseherde zu untersuchen.

Der Wirkstoff SKI-5C ist ein Inhibitor der Sphingosinkinase 1 und verhindert dadurch die Bildung von Sphingosin-1-Phosphat. SKI-5C wurde zunächst in einem murinen Rückenmarkkammermodell getestet. Dabei wurde eine Titankammer in die Rückenmarkshaut von Mäusen implantiert, in die Endometriumfragmente transplantiert wurden. Das Wachstum und die Vaskularisierung dieser Fragmente wurden mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei die Tiere entweder mit SKI-5C oder Vehikel als Kontrolle behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich, dass in der Behandlungsgruppe sowohl das Wachstum als auch die Vaskularisierung der induzierten Endometrioseherde inhibiert werden konnte. Dies führte zu einer signifikant

kleineren Herdgröße über den gesamten Zeitraum des Versuchs. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde SKI-5C zusätzlich in einem intraperitonealen Endometriosemodell getestet. Dazu wurden zuvor aus Spendermäusen entnommene Uterusstanzen an die peritoneale Bauchwand von Empfängermäusen transplantiert. Das Wachstum und die Entwicklung der so induzierten Endometrioseherde wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen mittels hochauflösender Ultraschall-Bildgebung analysiert. Dabei zeigte sich, dass SKI-5C das Wachstum der induzierten Endometrioseherde signifikant inhibierte. Diese Wirkung kann auf eine Hemmung der Angiogenese zurückgeführt werden, die zu einer verminderten Sauerstoffversorgung der Herde führte. Durch immunhistochemische Analysen wurde zusätzlich gezeigt, dass auch die Proliferation der Stromazellen in den Endometrioseherden gehemmt wurde.

In einem zweiten Studienabschnitt wurde, wie zuvor beschrieben, die Wirksamkeit von SEW2871, das den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 blockiert, im Rückenhautkammermodell untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieser Wirkstoff in der frühen Phase der Entwicklung von Endometrioseherden eine anti-angiogene Wirkung hat. Dennoch wiesen die Herde der Kontroll- und Behandlungsgruppe am Versuchsende eine vergleichbare Vaskularisierung und Größe auf.

In einem dritten Studienabschnitt wurde der Wirkstoff Fingolimod (FTY720) der die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1 sowie 3-5 hemmt, ebenfalls im Rückenhautkammermodell untersucht. Hierbei zeigte sich, dass FTY720 das Wachstum und die Entwicklung der induzierten Endometrioseherde leicht reduziert, wobei dieser Effekt am 10. Untersuchungstag am deutlichsten ausgeprägt war. Am Versuchsende waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe die Herdgröße und die Vaskularisierung betreffend zu erkennen.

Durch die Untersuchung der drei Wirkstoffe konnte erstmals gezeigt werden, dass insbesondere SKI-5C die Entwicklung von induzierten Endometrioseherden hemmen kann. Entsprechend könnte die Inhibition des Sphingosin-1-Phosphat-Signalweges durch die Hemmung der Sphingosinkinase-1 einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Endometriose darstellen.

2 SUMMARY

Endometriosis is a common gynecological disease affecting 10-20% of all women in reproductive age. It is defined by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Typical symptoms of endometriosis are dysmenorrhea, chronic lower abdominal pain, dyspareunia and infertility. To date, the mechanisms promoting the onset of endometriosis are not yet fully clarified. The implantation theory of Sampson represents a plausible explanation. This theory suggests that endometrial tissue fragments migrate retrogradely during menstruation into the abdominal cavity, where they develop into endometriotic lesions. These lesions are dependent on the development of new blood vessels (angiogenesis), which supply the tissue with oxygen and nutrients. Therefore, anti-angiogenic treatment strategies, such as those currently already applied in oncology, may also be effective in the therapy of endometriosis. For this purpose, the sphingosine-1-phosphate signaling pathway may be a possible target. The main effector of this signaling pathway is sphingosine-1-phosphate, which is generated intracellularly by the sphingosine kinases 1 and 2. Sphingosine-1-phosphate binds extracellularly to sphingosine-1-phosphate receptors and, thus, stimulates the proliferation and maturation of blood vessels. Based on this finding, the aim of the present work was to analyze for the first time the effect of the potentially anti-angiogenic compounds SKI-5C, SEW2871 and FTY720, which intervene in the sphingosine-1-phosphate signaling pathway, on the development of endometriotic lesions.

The compound SKI-5C is an inhibitor of sphingosine kinase 1 and thereby prevents the formation of sphingosine-1-phosphate. First, SKI-5C was tested in a dorsal skinfold chamber model. For this purpose, a titanium chamber was implanted in the dorsal skin of mice, in which endometrial fragments were transplanted. The growth and vascularization of these fragments were investigated by intravital fluorescence microscopy. The animals were either treated with SKI-5C or vehicle as control. It was found that in comparison to the control group, both growth and vascularization of the induced endometriotic lesions were significantly suppressed in the treatment group. This resulted in a significantly smaller lesion size throughout the entire observation period. Based on these promising results, SKI-5C was additionally tested in an intraperitoneal endometriosis model. For this purpose, uterine tissue samples from donor mice were transplanted to the peritoneal abdominal wall of recipient mice. The growth and development of the induced endometriotic lesions were analyzed over a period of 28 days by

means of high-resolution ultrasound imaging. It was found that SKI-5C significantly reduces the growth of induced endometriotic lesions. This effect can be attributed to an inhibition of angiogenesis, which leads to a reduced oxygen supply of the lesions. Immunohistochemical analyses further revealed that the proliferation of stromal cells within the endometriotic lesions was also inhibited.

In the second part of this study, the efficacy of SEW2871, which inhibits the sphingosine-1-phosphate receptor 1, was investigated in the dorsal skinfold chamber model. This compound exerted an anti-angiogenic effect in the early phase of the development of endometriotic lesions. However, the lesions of the control and treatment group showed a comparable vascularization and size at the end of the experiments.

In the third part of this study the compound fingolimod (FTY720), which inhibits the sphingosine-1-phosphate receptors 1 and 3-5, was also tested in the dorsal skinfold chamber model. It was observed that FTY720 slightly reduces the growth and development of induced endometriotic lesions. This effect was most pronounced on day 10. However, at the end of the experiments no significant differences were observed between the control and treatment groups in terms of lesion size and vascularization.

By testing the three compounds, it could be demonstrated for the first time that particularly SKI-5C inhibits the development of induced endometriotic lesions. Accordingly, the inhibition of the sphingosine-1-phosphate signaling pathway by blocking sphingosine kinase-1 may represent a new therapeutic approach for the treatment of endometriosis.

3 EINLEITUNG

3.1 Endometriose

3.1.1 Definition und Epidemiologie der Endometriose

Die Endometriose ist eine gynäkologische Erkrankung, an der 10-20 % aller Frauen im reproduktiven Alter erkranken [WHEELER, 1989]. Zu ihren Leitsymptomen gehören Dysmenorrhoe, chronische Unterbauchschmerzen, Dyspareunie und Infertilität [GIUDICE und KAO, 2004]. Die Endometriose wird durch das Auftreten von endometrialem Drüsen- und Stromagewebe, sogenannte Endometrioseherde, außerhalb der Uterushöhle definiert [CHILD und TAN, 2001]. Ihre Prävalenz ist bei Frauen orientalischer Herkunft erhöht, während afro-amerikanische Frauen seltener erkranken [MISSMER und CRAMER, 2003]. Weitere Risikofaktoren sind Alkohol- und Koffeinkonsum [MISSMER und CRAMER, 2003]. Eine frühe Menarche, Dysmenorrhoe und ein kurzer Menstruationszyklus treten bei den erkrankten Frauen gehäuft auf [MISSMER und CRAMER, 2003].

Abhängig von der Lokalisation der Endometrioseherde wird zwischen einer *Endometriosis genitalis interna*, *Endometriosis genitalis externa* und *Endometriosis extragenitalis* unterschieden [HALIS et al., 2010]. Die *Endometriosis genitalis interna* wird auch als *Adenomyosis uteri* bezeichnet, wobei die Herde im Myometrium lokalisiert sind. Bei der *Endometriosis genitalis externa* sind die Organe des kleinen Beckens, vor allem das *Ligamentum sacrouterina*, die Ovarien und der Douglas-Raum betroffen. Die *Endometriosis extragenitalis* siedelt sich außerhalb des kleinen Beckens an. Dabei sind Blase, Darm, Peritoneum und in selteneren Fällen auch Lunge, Leber, Pankreas und Lymphknoten betroffen.

Die American Society of Reproductive Medicine (ASRM) teilt den Schweregrad einer Endometriose in vier verschiedene Stadien, von minimaler bis schwerer Endometriose, ein. Dabei werden über ein Punktesystem die Anzahl, die flächenmäßige Ausbreitung und die Lokalisation der Herde, aber auch die Ausprägung von Verwachsungen bewertet [HAAS et al., 2013]. Da bei dieser Einteilung die Tiefe der infiltrierenden Endometrioseherde nicht berücksichtigt wird, erfolgt zusätzlich eine Klassifikation nach ENZIAN [ADAMSON, 2011], bei der Herde, die nicht in die Breite, aber in die Tiefe wach-

sen, zu einer Erhöhung des Schweregrades führen. Beide Beurteilungssysteme beziehen allerdings die klinischen Symptome der Krankheit, wie Schmerzen und Infertilität, nicht in die Beurteilung ein [HAAS et al., 2013].

3.1.2 Pathogenese der Endometriose

Obwohl die Endometriose bereits sehr lange erforscht wird, konnte der Mechanismus, der zur Entstehung von Endometrioseherden führt, noch immer nicht hinreichend geklärt werden. Nach der Implantationstheorie von Sampson gelangen endometriale Zellen durch retrograde Menstruation über die Eileiter in den Bauchraum [SAMPSON, 1927a]. Dort adhären sie am Peritoneum und an den Organen des kleinen Beckens. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass es physiologisch bei 76-90 % aller Frauen zu einer retrograden Menstruation mit einer Ansammlung von Menstruationsblut vor allem im Douglas-Raum kommt [HALME et al., 1984]. Die endometrialen Zellen, die sich im Menstruationsblut befinden, sind darüber hinaus auch vital und in der Lage, Endometrioseherde zu bilden [D'HOOGHE et al., 1995]. Allerdings entwickelt sich trotz des häufigen Vorkommens von retrograder Menstruation nur bei 10-20 % aller Frauen eine Endometriose [WHEELER, 1989]. Außerdem kann die Implantationstheorie nicht erklären, wie es in seltenen Fällen zur Entstehung einer Endometriose bereits vor dem Einsetzen der ersten Menstruation oder auch bei Männern nach einer Östrogen-therapie kommt [CLARK, 1948; SCHRODT et al., 1980]. Ein anderer Ansatz von SAMPSON [1927b] für die Erklärung der Entstehung einer Endometriose ist die lymphatisch/vaskuläre Metastasierungstheorie. Dabei wird davon ausgegangen, dass endometriale Zellen über die Lymph- und Blutbahnen an entferntere Orte gelangen können, um dort Endometrioseherde auszubilden.

MEYER stellte 1919 die Theorie der Metaplasie auf, die auf der Erkenntnis basiert, dass Peritoneum und Endometrium aus dem gleichen embryonalen Gewebe gebildet werden, dem Coelomepithel. Durch eine metaplastische Umwandlung der Stammzellen dieses Gewebes sollen in der kleinen Beckenhöhle Endometrioseherde entstehen. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass die Herde dabei gleichmäßiger in der Bauchhöhle verteilt sein müssten und es auch häufiger zum Auftreten von Endometrioseherden in der Thoraxhöhle kommen müsste. Außerdem wäre zu erwarten, dass Männer genauso häufig wie Frauen betroffen sind [OLIVE und SCHWARTZ, 1993].

RUSSELL [1979] nahm an, dass Endometrioseherde aus den Überresten der Müller-schen Gänge entstehen. Dies wird dadurch gestützt, dass es bei Frauen mit gestörter

Entwicklung der Müllerschen Gänge etwa durch Fusionsstörungen, bei denen die Gebärmutter nicht richtig zusammenwächst und zweigliedrig oder septiert ist, zu einer höheren Endometrioserate kommt [NAWROTH et al., 2006].

Ein weiterer Erklärungsansatz zur Entstehung der Endometriose ist die immunologische Theorie [OOSTERLYNCK et al., 1991]. Dabei wird das Überleben von ektopem endometrialem Gewebe in der Bauchhöhle auf die verringerte Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der Peritonealflüssigkeit zurückgeführt. Während bei gesunden Frauen die endometrialen Zellen nach dem Reflux in die Bauchhöhle durch NK-Zellen beseitigt werden, liegt bei Endometriose-Patientinnen eine geringere NK-Zellaktivität vor. Darüber hinaus können Endometrioseherde auch über eine Resistenz gegenüber NK-Zellen verfügen. Diese Resistenz und die Umgehung der Immunabwehr erfolgen durch die Sekretion von Proteinen aus den endometrialen Zellen, wodurch es zu einer gestörten Bindung zwischen den Immunzellen und dem ektopen Gewebe kommt [LEBOVIC et al., 2001]. KANZAKI et al. [1992] konnten sowohl im Serum als auch in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen feststellen, dass im Vergleich zu gesunden Frauen eine verstärkte NK-Zell-Inhibition vorliegt.

Aus den zuvor erläuterten Theorien wurde die Induktionstheorie abgeleitet [LEVANDER und NORMANN, 1955]. Dabei kommt es nach dem retrograden Reflux von Menstruationsblut in die Bauchhöhle aufgrund verschiedener biochemischer und immunologischer Faktoren zu einer Implantation und Proliferation der ektopen Zellen und dadurch zur Entstehung von Endometrioseherden. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass eine erhöhte Aktivität von peritonealen Makrophagen, eine verringerte Aktivität von T- und NK-Zellen und ein verstärktes Vorkommen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren festgestellt werden konnten, welche die Angiogenese und Proliferation von ektopem Endometrium fördern [LEVANDER und NORMANN, 1955].

Eine weitere wichtige Komponente bei der Entstehung einer Endometriose ist die endogene Östradiolproduktion in den Endometrioseherden. Im Unterschied zum eutopen Endometrium konnte in Endometrioseherden die Bildung von Östron durch die Umwandlung von Androstendion mittels Aromatase P450 nachgewiesen werden [KITAWAKI et al., 1997]. Sowohl in eutopem als auch in ektopem Endometrium katalysiert die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β HSD)-Typ 1 die Umwandlung von schwachem Östron in das potente 17 β -Östradiol (E2). Im eutopen Endometrium wird

die Inaktivierung von E2 durch Umwandlung in Östron durch die 17 β HSD-Typ 2 katalysiert. Im ektopen Gewebe kommt es zu einer reduzierten Expression der 17 β HSD-Typ 2, wodurch die Inaktivierung von E2 in den Endometrioseherden stark beeinträchtigt wird. Die reduzierte Expression von 17 β HSD-Typ 2 kann auf sehr geringe Progesteronlevel zurückgeführt werden, die *in vivo* in ektopem Endometrium gemessen wurden [ZEITOUN et al., 1998]. E2 fördert maßgeblich die Entwicklung und das Wachstum von Endometrioseherden [ZEITOUN et al., 1998; BULUN et al., 2001]. Dabei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass E2 die Zellproliferation bei der Endometriose stimuliert, indem es den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)-Signalweg über den Transkriptionsfaktor Nuclear kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)/Phosphatase und den von der Phosphatase und dem Tensinhomolog (PTEN)-abhängigen Signalweg aktiviert [ZHANG et al., 2010].

In den letzten Jahren wurde auch eine genetische Komponente der Endometriose diskutiert. Die Tatsache, dass die Erkrankung bei 5-7 % der Verwandten ersten Grades auftritt, spricht für einen polygenen Mechanismus, bei dem die Ausbildung einer Endometriose und vor allem von schweren Formen durch einen kumulativen Effekt von mehreren Genen beeinflusst wird [BISCHOFF und SIMPSON, 2004].

3.1.3 Diagnostik und Therapie der Endometriose

Nach wie vor gilt die Laparoskopie mit anschließender histologischer Abklärung als sicherstes Verfahren zur Diagnose einer Endometriose [SCARSELLI et al., 2005]. Dabei ist der histologische Nachweis von wenigstens zwei der drei folgenden Kriterien erforderlich: Glanduläre Strukturen, endometroides Stroma und pigmentierte Makrophagen [KENNEDY et al., 2005]. Nur dadurch kann der Verdacht auf das Vorliegen einer Endometriose bestätigt werden, der meist bereits nach erfolgter Anamnese und vaginaler Untersuchung aufgekommen ist. Darüber hinaus können Endometrioseherde auch gut mittels transvaginaler Sonographie dargestellt werden [HUDELIST et al., 2009]. Die meisten Herde erscheinen sphärisch und vom Uterus getrennt und sind zystisch oder vorwiegend zystisch mit verstreuten peripheren Echos [COLEMAN et al., 1979].

Da die Pathogenese der Endometriose noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, konnte bislang auch keine kausale Therapie entwickelt werden. Die heutigen Therapieansätze hängen vom Schweregrad der Erkrankung, vom Leidensdruck, vom Alter und vom Kinderwunsch der betroffenen Patientinnen ab.

Die medikamentöse Therapie gliedert sich dabei zum einen in eine anti-hormonelle und zum anderen in eine schmerzstillende Therapie. Eine rein analgetische Therapie wird vor allem bei milden Verläufen der Endometriose eingesetzt. Dabei werden nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAID) eingesetzt, welche die Prostaglandinproduktion hemmen und so die Schmerz- und Entzündungskaskade supprimieren [HALIS et al., 2010]. Zur Gruppe der NSAIDs gehören die nicht-selektiven Cyclooxygenase [COX]-1/2-Inhibitoren, wie Ibuprofen und Diclofenac, und die selektiven COX-2-Inhibitoren, wie Celecoxib und Valdecoxib. Die beiden letzteren Medikamente werden wegen geringerer Nebenwirkungen bevorzugt zur Behandlung von Schmerzen im Zusammenhang mit Endometriose sowie bei postoperativen Schmerzen nach Entfernung von Endometrioseherden und Hysterektomie eingesetzt [HAYES und ROCK, 2002].

Zu den Medikamenten, die in den Hormonstoffwechsel eingreifen, gehören vor allem Androgene, Ovulationshemmer (Gestagene), Analoga des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH-Agonisten) und Progestine, da es sich bei der Endometriose um eine östrogenabhängige Erkrankung handelt [ZITO et al., 2014]. Danazol ist ein synthetisches Testosteron-Derivat mit anti-gonadotropischen Effekten [GREENBLATT et al., 1971]. Das Androgen inhibiert die Hypophysen-Tätigkeit, in dem es reversibel die zyklische Freisetzung des follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des luteinisierenden Hormons (LH) hemmt, wodurch die Ovulation ausbleibt. Die sich daraus ergebende geringe Östrogenkonzentration führt nicht nur zu einer verminderten Proliferation des Endometriums im Uterus, sondern auch der Endometrioseherde [FRANCHIMONT und CRAMILION, 1977]. Wegen seiner vielen Nebenwirkungen, die vor allem auf erhöhten Testosteronkonzentrationen basieren, wird Danazol jedoch kaum noch angewendet [BARBIERI und RYAN, 1981]. Gestagene und Östrogene werden als Ovulationshemmer bezeichnet. Sie hemmen darüber hinaus auch die Freisetzung von FSH und LH und vermindern dadurch, wie die Androgene, die Proliferation des Endometriums. Die synthetisch hergestellten Progestine imitieren dagegen die Wirkung von Progesteronen, die nach der Ovulation aus dem *Corpus luteum* freigesetzt werden und ebenfalls die Proliferation des Endometriums hemmen. Außerdem inhibieren sie auch die Freisetzung von GnRH, was zu niedrigen Konzentrationen von FSH und LH führt [GEZER und ORAL, 2015]. Zu den GnRH-Agonisten gehören Buserelin, Goserelin, Leuprorelin und Triptorelin. Sie blockieren durch ihre analoge Struktur die GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse und führen bei kontinuierlicher Gabe durch eine Dauerstimulation zu

einer verminderten Expression der Rezeptoren, wodurch die LH- und FSH-Spiegel gesenkt werden. Wichtige Nachteile dieser Therapie sind bei längerfristigen Behandlungen eine Verringerung der Knochendichte und ein erhöhtes Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [PICKERSGILL, 1998].

Einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt bilden die Aromatasehemmer. Im Unterschied zum gesunden eutopen Endometrium ist in Endometrioseherden eine erhöhte Aktivität der Aromatase nachweisbar, die durch Prostaglandin stimuliert wird [BULUN et al., 2005]. Dies führt zu einer lokalen Produktion von E2, das durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Prostaglandin-Bildung induziert. Durch diesen Mechanismus kann eine kontinuierliche Produktion von Prostaglandin und E2 ermöglicht werden. Mit Aromatasehemmern wie Anastrozol konnte in Kombination mit einem oralen Kontrazeptivum bei Endometriose-Patientinnen eine Verringerung der Schmerzsymptomatik um durchschnittlich 40 % erreicht werden [AMSTERDAM et al., 2005].

Die medikamentöse Behandlung ist bei Patientinnen mit mittelschwerer bis schwerer Endometriose und tief-infiltrierender Endometriose oft nicht ausreichend und erfordert daher eine Kombination von operativer und medikamentöser Therapie [MEULEMAN et al., 2013]. Zur vollständigen Entfernung von peritonealen, ovariellen und tief-infiltrierenden Endometrioseherden und ihren Adhäsionen wird ein minimal-invasives laparoskopisches Vorgehen bevorzugt. Dabei führt die Entfernung der Herde nachweislich zu einer deutlichen Reduktion der Schmerzen [JACOBSON et al., 2009]. Nachteilig sind allerdings bei dieser Form der organerhaltenden operativen Therapie die hohe Rezidivrate von 11-32 % innerhalb von 1-5 Jahren nach dem Eingriff. Bei Frauen ohne Kinderwunsch und mit Uterusbefall wird daher eine Hysterektomie präferiert [KOGA et al., 2013].

Trotz der vielen Behandlungsmöglichkeiten ist die Situation aufgrund der hohen Rezidivrate der Endometriose und den zum Teil starken Nebenwirkungen der eingesetzten Medikamente noch immer unbefriedigend. Daher wird experimentell seit einigen Jahren eine weitere Strategie zur Behandlung der Endometriose durch den Einsatz von Substanzen mit anti-angiogener Aktivität verfolgt. Zu diesen Substanzen gehören z. B. COX-2-Inhibitoren [LASCHKE et al., 2007], das Makrolid-Antibiotikum Rapamycin [LASCHKE et al., 2006] und der E2-Metabolit 2-Methoxyestradiol [BECKER et al., 2008]. Inhibitoren von vascular endothelial growth factor (VEGF), wie z. B. Bevacizu-

mab [RICCI et al., 2011], führten ebenfalls zu einer Inhibition der Angiogenese in Endometrioseherden. Außerdem wurden Phytosubstanzen, wie z. B. Xanthothumol [RUDZITIS-AUTH et al., 2012], Resveratrol [RUDZITIS-AUTH et al., 2013], Epigallocatechin-3-gallat [LASCHKE et al., 2008] und Indol-3-Carbinol [RUDZITIS-AUTH et al., 2022], erfolgreich in murinen Endometriosemodellen für eine anti-angiogene Therapie eingesetzt. Die Tatsache, dass diese Substanzen durch die Inhibition der Vaskularisierung zu einer Regression von Endometrioseherden führen, zeigt, dass die Hemmung der Angiogenese ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die zukünftige klinische Behandlung sein könnte [ROCHA et al., 2013].

3.2 Angiogenese

3.2.1 Die physiologische Angiogenese

Als Angiogenese (von gr.: *ángos* = Gefäß und *génesis* = Entstehung) bezeichnet man die Entstehung neuer Blutgefäße durch das Aussprossen aus bereits bestehenden Gefäßen. Die Angiogenese unterscheidet sich dabei von der Vaskulogenese, bei der die Gefäßneubildung aus Angioblasten, den Progenitorzellen des Gefäßendothels, während der Embryonalentwicklung erfolgt. Bei Erwachsenen kommt es physiologisch bei der Wundheilung, der Bildung des *Corpus luteum* und im Endometrium zur Angiogenese [GORDON et al., 1995]. Unter pathologischen Bedingungen ist die Angiogenese u. a. bei der Tumorgenese und bei der Entstehung einer Endometriose von großer Bedeutung.

Die Entwicklung neuer Blutgefäße wird durch zahlreiche pro-angiogene Faktoren stimuliert. Dadurch kommt es zunächst zu einer enzymatischen Lyse der Basalmembran der bestehenden Gefäße durch Matrixmetalloproteinasen (Abb. 1). Danach bilden sich endotheliale Zellausläufer (Pseudopoden) aus und die Migration der Endothelzellen entlang eines chemotaktischen Reizes beginnt. Im Anschluss daran erfolgt eine Differenzierung der Endothelzellen in Tip-Zellen, die mobil sind und die Spitze der so entstehenden Gefäßsprossen bilden, und Stalk-Zellen, die an der Basis der Sprossen proliferieren [PHNG und GERHARDT, 2009]. Tip-Zellen sind Leitzellen, welche die Richtung der Gefäßsprossen vorgeben, denen dann die Stalk-Zellen folgen [HASAN et al., 2017].

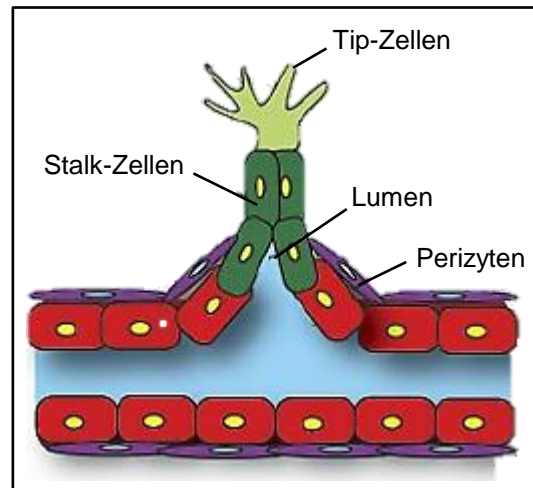


Abbildung 1: Darstellung eines angiogenen Gefäßsprosses mit der Differenzierung von Endothelzellen in Tip- und Stalk-Zellen, der Lumenbildung und der Verstärkung der Basalmembran durch Perizyten. [entnommen aus https://www.researchgate.net/figure/Mechanisms-of-angiogenesis-Graphic-depiction-of-the-cellular-mechanisms_fig3_227171162].

Innerhalb eines Gefäßsprosses bilden Endothelzellen das Lumen aus und Perizyten werden zur Verstärkung in die neu entstandene Basalmembran eingebettet [FOLKMAN, 1984].

3.2.2 Angiogenese bei der Endometriose

Die Endometriose gehört zu den Angiogenese-abhängigen Erkrankungen, da Endometrioseherde nur überleben können, wenn sie ausreichend vaskularisiert sind [GROOTHUIS et al., 2005]. Makroskopisch und histologisch können neu entstandene rote Endometrioseherde, die als besonders aktiv gelten, gut von älteren schwarzen bzw. pigmentierten und weißen Herden unterschieden werden [JANSEN und RUSSELL, 1986]. Die roten Herde erhalten ihre Farbe durch eine besonders hohe Gefäßdichte, während die schwarzen und weißen Herde meist fibrosiert sind und nur wenige Blutgefäße aufweisen [LASCHKE und MENGER, 2007]. DONNEZ et al. [1998] konnten zeigen, dass in roten Endometrioseherden vor allem VEGF exprimiert wird. MCLAREN et al. [1996] leiteten daraus ab, dass VEGF ein zentraler Regulator bei der Entwicklung von Endometrioseherden ist und die Konzentration von VEGF in der peritonealen Flüssigkeit mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert [MCLAREN, 2000]. Neben VEGF wurden zahlreiche weitere pro-angiogene Faktoren identifiziert, welche die Vaskularisierung von Endometrioseherden fördern. Dazu gehören u. a. fibroblast growth factor (FGF) [Ferriani et al., 1993], platelet-derived growth factor (PDGF) [SURREY und HALME, 1991], Erythropoetin (EPO) [MATSUZAKI et al.,

2001], Angiogenin [SUZUMORI et al., 2004] und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) [SANTULLI et al., 2012].

Weil bekannt ist, dass in Endometrioseherden der S1P-Signalweg dysreguliert ist [SANTULLI et al., 2012], wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig der Einfluss dieses Signalwegs auf die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden untersucht.

3.3 Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg

Der S1P-Signalweg (Abb. 2) spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Tumorgenese als auch bei vaskulären Erkrankungen und Entzündungen [MACEYKA et al., 2012]. Das bioaktive Lipid S1P ist der Haupteffektor dieses Signalwegs [PYNE und PYNE, 2010]. S1P gehört zu den Sphingolipiden und ist ein Lipidmediator, dessen Biosynthese zunächst aus Sphingolipid und Sphingomyelin erfolgt. Die Sphingomyelinase bewirkt die Abspaltung von Phosphocholin, wodurch Ceramid entsteht. Die Ceramidase wandelt das Ceramid durch Hydrolyse in Sphingosin um. Durch die Phosphorylierung von Sphingosin durch die Sphingosinkinase (SPHK) 1 und 2 wird S1P gebildet [SANTULLI et al., 2012]. Der Abbau von S1P erfolgt im endoplasmatischen Retikulum durch die S1P-Lyase, die S1P irreversibel zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin abbaut [BANDHUVULA et al., 2005]. Die S1P-Phosphatase führt zur Dephosphorylierung von S1P [JOHNSON et al., 2003].

S1P reguliert eine Vielzahl von biologischen Funktionen, wie Zellproliferation und Zellüberleben, Apoptose, Migration, Adhärenz, Entzündung und Angiogenese [ZHANG et al., 1991]. Außerdem ist der S1P-Signalweg an der embryonalen Angiogenese beteiligt [KONO et al., 2004] und reguliert u. a. Wachstumsfaktoren, Hormone, Chemokine, Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies [NGÔ et al., 2009]. Die SPHK wurde von LI et al. [2016] als zellulärer Konverter beschrieben, der das Schicksal einer Zelle bestimmt. Denn erst durch die von der Kinase induzierte Umwandlung von Sphingosin in S1P kann das Lipid an die S1P-Rezeptoren (S1PR) binden.

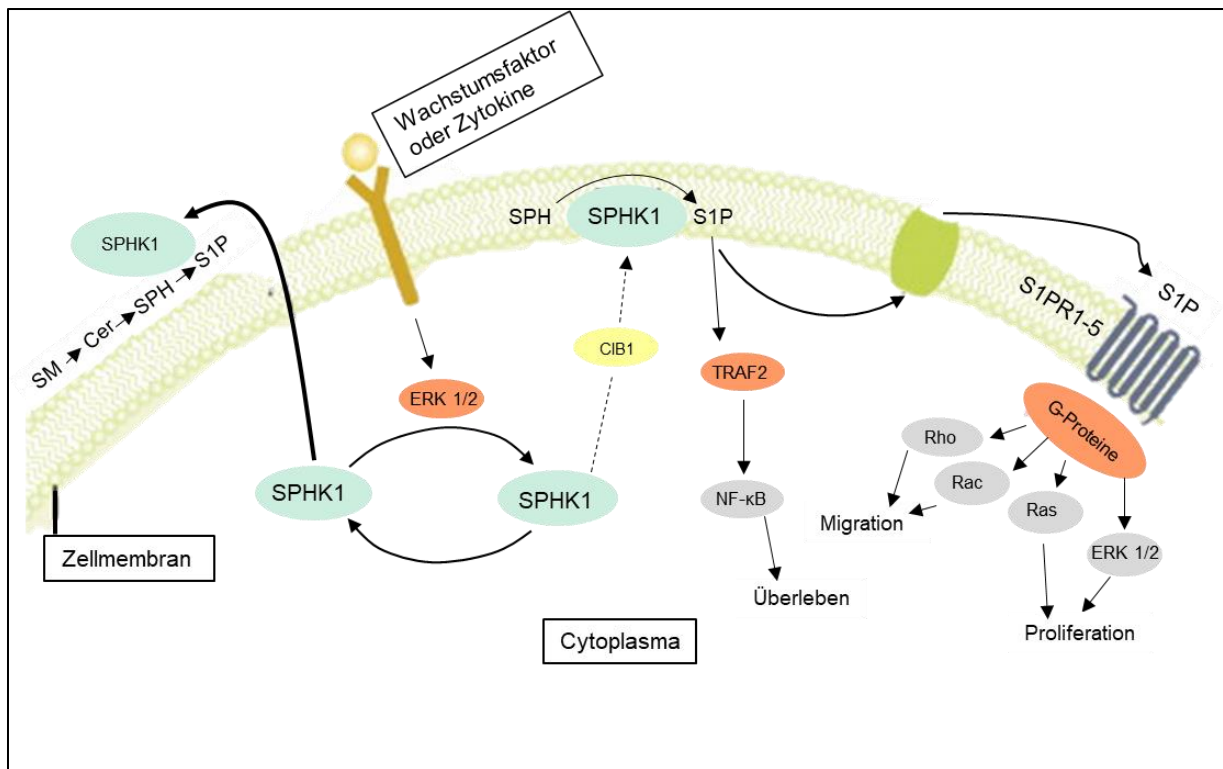


Abbildung 2: Schematische Darstellung des S1P-Signalwegs.

Es gibt 2 Arten von SPHK. Die SPHK1 befindet sich hauptsächlich im Cytoplasma, während die SPHK2 im Zellkern lokalisiert ist. Nach der Aktivierung der extrazellulären und signalregulierten Kinase 1/2 (ERK1/2) durch S1P selbst oder einen Zytokin- und Wachstumsfaktorstimulus, wie z. B. E2, PDGF, VEGF, epidermal growth factor (EGF) oder hepatocyte growth factor (HGF), gelangt die SPHK1 aus dem Cytoplasma zur Zellmembran, wo S1P gebildet wird [HOBSON et al., 2001; SHU et al., 2002]. Der Transport von SPHK1 erfolgt durch eine Interaktion mit dem Calcium- and Integrin-binding Protein 1 (CIB1) [YESTER et al., 2011]. Die SPHK2 befindet sich hauptsächlich im Zellkern und in den Mitochondrien. Ihre Aktivierung erfolgt ebenfalls über eine ERK1/2-vermittelte Stimulation. Das intrazellulär entstandene S1P wird über spezifische Transporter aus der Zelle transferiert, wie z. B. Spinster 2 [FUKUHARA et al., 2012].

Extrazellulär bindet S1P an einen der fünf S1PRs (1-5), wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird, welche die Angiogenese, das Wachstum, das Überleben und die Migration einer Zelle reguliert. Die S1PRs sind an G-Proteine gekoppelt, die durch eine Ligandenbindung durch Autophosphorylierung oder eine ligandenunabhängige Phosphorylierung aktiviert werden können. Wie im Review von SPIEGEL und MILSTIEN

[2002] beschrieben, ist S1P der Ligand für die Rezeptoren S1PR1-5, die ubiquitär extrazellulär an Zelloberflächen vorkommen. Darüber hinaus kann S1P auch direkt an intrazelluläre Targets binden, die lange Zeit nicht identifiziert werden konnten.

Mittlerweile ist bekannt, dass S1P mehrere unterschiedliche intrazelluläre Proteine binden und verändern kann [MACEYKA et al., 2012]. Dazu gehört z. B. der mit dem Rezeptor für den Tumornekrosefaktor (TNF)- α assoziierte Faktor 2 (TRAF2). TRAF2 ist ein Adapterprotein, das bei der Aktivierung von NF- κ B wirksam ist, wobei S1P einen Cofaktor bildet, der für die Ligaseaktivität von TRAF2 und dadurch auch für die NF- κ B-Aktivierung erforderlich ist [ALVAREZ et al., 2010]. Der stimulierende Einfluss von NF- κ B im Rahmen der Pathophysiologie der Endometriose auf die Angiogenese und der Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen durch die Regulierung von Zytokinen, Makrophagen und der COX-2- und Prostaglandin-Expression ist bereits bekannt [KAPONIS et al., 2012].

Die Rezeptoren S1PR1 und 3 werden auf Endothelzellen exprimiert und haben eine wichtige Funktion bei der Angiogenese. Wenn der Blutfluss in einem neuen Gefäß einsetzt, dann bindet S1P an S1PR1, wodurch der Rho- und der Rac-Signalweg aktiviert werden. Durch die Zunahme von Aktin-Lamellipodien (Rac) und den Umbau des Aktinzytoskeletts (Rho) wird die Barrierefunktion des Endothels gestärkt [TÖLLE et al., 2016]. Außerdem fördert die S1P-S1PR1-Bindung den N-Cadherin-Transport und die Verstärkung der von N-Cadherin abhängigen Zell-Zell-Adhäsion mit den Wandzellen des Gefäßsystems [PAIK et al., 2004].

Die SPHK-Aktivität und die S1P-Konzentration werden durch das Signalmolekül VEGF über eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) erhöht. Die SPHK1-Stimulation führt dann zur Aktivierung der Signalmoleküle Ras und ERK1/2, die Bestandteile des mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalwegs (MAPK) sind, wodurch die endotheliale Zellproliferation gesteigert wird [SHU et al., 2002]. Die Bedeutung von SPHK bei der Blutgefäßbildung konnte in einem Experiment mit Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Bei diesen Tieren führte eine Deaktivierung von SPHK1 und 2 zu einer embryonalen Letalität. Wenn allerdings nur eine der beiden Kinasen fehlte, konnte immer noch ausreichend S1P produziert werden, sodass die Embryonen vital blieben [MIZUGISHI et al., 2005]. In einer weiterführenden Studie wurden bei triple-knockout-Mäusen die Rezeptoren S1PR1, 2 und 3 deaktiviert. Auch diese Tiere waren durch eine unvollständige vaskuläre Reifung nicht überlebensfähig. Darüber hinaus verstarben dabei

aber auch die single-knockout-Mäuse, bei denen nur S1PR1 deaktiviert wurde [KONO et al., 2004]. Der alleinige Knockout von S1PR2 oder 3 war dagegen embryonal nicht letal. Dennoch konnten die vorherigen Studien zeigen, dass diese Rezeptoren ebenfalls einen Einfluss auf die Gefäßfunktion ausüben [SCHUCHARDT et al., 2011].

SANTULLI et al. [2012] konnten nachweisen, dass der pro-angiogene S1P-Signalweg in Endometrioseherden dysreguliert ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass die SPHK-Aktivität in ektopem Endometrium um mehr als 100-fach gesteigert ist, sodass das Vorkommen von S1PR1 in Endometrioseherden signifikant höher ist als in eutopem Endometrium. Außerdem kommt auch der S1PR2 sowohl in Endometrioseherden als auch im Endometrium erkrankter Frauen verstärkt vor. Darüber hinaus ist der S1P-Katabolismus in Endometrioseherden durch eine im Vergleich zum Endometrium 3- bis 16-fach verringerte Expression der S1P-Phosphatase und S1P-Lyase reduziert, wodurch S1P akkumuliert.

Die Ergebnisse dieser bisherigen Untersuchungen unterstützen die Annahme, dass der S1P-Signalweg in Endometrioseherden pathologisch hochreguliert ist. Dabei ist es bisher allerdings unklar, ob und inwieweit Wirkstoffe, die den S1P-Signalweg inhibieren, die Angiogenese und das Wachstum von Endometrioseherden hemmen können. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit diese Fragestellung erstmalig mit den Substanzen SKI-5C, SEW2871 und FTY720, die über unterschiedliche Mechanismen auf den S1P-Signalweg einwirken, in tierexperimentellen Endometriose-Modellen untersucht.

3.4 Wirkstoffe

3.4.1 SKI-5C

Der Sphingosinkinase-Inhibitor 5C (Synonym: 2,2-Dimethyl-4S-(1-oxo-2-hexadecyn-1-yl)-1,1-dimethylethylester-3-oxazolidinecarboxylic acid, SKI-5C) (Abb. 3) ist ein selektiver Inhibitor der SPHK1 [WONG et al., 2009].

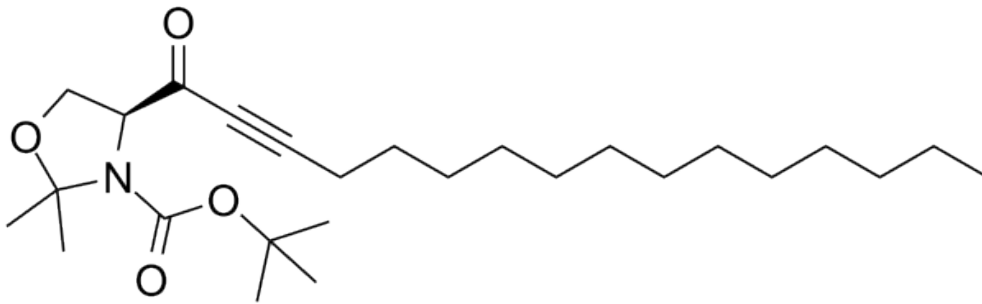


Abbildung 3: Strukturformel von SKI-5C.

In verschiedenen Tumorstudien wurde der Einfluss dieses Inhibitors bereits untersucht. Die *in vitro* Hemmung der SPHK1-Aktivität führte dabei zu einem G1-Arrest und einer dosisabhängigen Induktion der Apoptose in Mamma-Karzinomzellen [DATTA et al., 2014]. Diese Wirkung konnte *in vivo* in Brustkrebs-Xenotransplantaten bestätigt werden [DATTA et al., 2014]. SKI-5C hemmte das Tumorwachstum somit durch eine Induktion der Apoptose und eine Reduktion der Zellproliferation. Weiterführende Untersuchungen innerhalb dieser Studie konnten nachweisen, dass SKI-5C zu einem dauerhaften Abfall der S1P-Konzentrationen führt. Die damit verbundene verminderte Aktivierung der Rezeptoren S1PR1-5 hatte auch eine verminderte Aktivierung der Protein-Kinase B (AKT) und ERK1/2 zur Folge [DATTA et al., 2014].

WANG et al. [2018] konnten in einem *in vitro* Versuch mit Brustkrebszellen zeigen, dass SPHK1 die Aktivierung des durch S1P induzierten Notch-Signalwegs über S1PR3 vermittelt und nahmen daher an, dass eine Hemmung von SPHK1 bei Krebspatienten eine vielversprechende therapeutische Strategie darstellen könnte. Bei Erwachsenen ist der Notch-Signalweg an der Zelldifferenzierung beteiligt, weshalb es bei Störungen zu Erkrankungen wie Krebs kommen kann. Dass der Notch-Signalweg auch einen Einfluss auf die Angiogenese in Endometrioseherden hat, wurde bereits nachgewiesen [KÖRBEL et al., 2018].

Außerdem konnte belegt werden, dass bei akutem Leberversagen die Kinase-Inhibition zu einer Verminderung der Transaminase-Aktivität und einer Hemmung von Enzymen des MAPK-Signalwegs führt [TIAN et al., 2016], was dann auch mit einer verringerten Konzentration der inflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin (IL)-6 verbunden ist.

LI et al. [2016] untersuchte die Wirkung von SKI-5C auf Nephroblastome (Wilm's Tumor), wobei es durch die Hemmung der Phosphorylierung von ERK1/2 und NF- κ B p65 zu einer Inhibition der Zellproliferation kam. Im Mausmodell konnte darüber hinaus eine dosisabhängige Wachstumsreduktion der Tumore beobachtet werden. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine gesteigerte Apoptoserate und den Einfluss auf den MAPK/NF- κ B Signalweg zurückzuführen [LI et al., 2016].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass in SPHK1-knockout-Mäusen die Konzentration von S1P im Plasma signifikant um 65 % verringert ist. Daraus lässt sich ableiten, dass SPHK1 einen zentralen Faktor bei der Bildung von S1P darstellt [VENKATARAMAN et al., 2008].

3.4.2 SEW2871

Bei SEW2871 handelt es sich um einen selektiven S1PR1-Agonisten, der strukturell nicht mit S1P verwandt ist (Abb. 4). Für die Bindung an den Rezeptor ist somit auch keine Phosphorylierung erforderlich [DONG et al., 2014]. SEW2871 führt nicht zur Degradierung des Rezeptors, sondern, ähnlich wie S1P, zu einer reversiblen Internalisierung [JO et al., 2005].

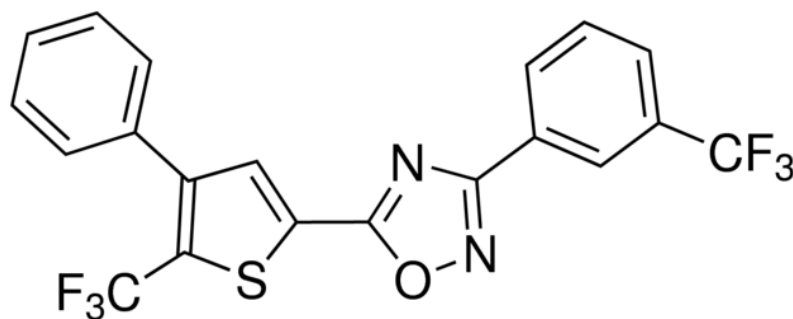


Abbildung 4: Strukturformel von SEW2871.

Die Wirkung von SEW2871 auf die Angiogenese wird kontrovers diskutiert. So konnten einerseits WANG et al. [2018] nachweisen, dass SEW2871 die Proliferation von endothelialen Progenitorzellen (EPCs) fördert und auch ihre Apoptose hemmt, wobei der proliferationsfördernde Effekt hauptsächlich durch S1PR3 vermittelt wird. EPCs können durch Proliferation, Migration und Differenzierung in Endothelzellen geschädigtes Gefäßendothel reparieren und die Angiogenese in Tumoren induzieren [NOLAN et al., 2007]. Bereits vorher konnten WANG et al. [2015] zeigen, dass EPCs über PDGF- β

stimuliert werden und dass der S1PR/PDGFR- β /Akt-Signalweg an der S1P-induzierten Migration und Angiogenese von EPCs beteiligt ist. Demgegenüber zeigten SOLEIMANI et al. [2011], dass die Gefäßdichte von humanen ovariellen Xenotransplantaten in Mäusen bei der Behandlung mit SEW2871 signifikant reduziert wurde und der Anteil an hypoxischem Gewebe zunahm. Außerdem führte SEW2871 u. a. zu verminderten Konzentrationen von intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 [LIEN et al., 2006]. Diesem Molekül wird eine wichtige Funktion bei der EPC-Rekrutierung [WU et al., 2006] und eine fördernde Funktion bei der Neovaskularisierung zugeschrieben [BUI et al., 2020]. ICAM-1 wird von Endometriumzellen während des gesamten Menstruationszyklus exprimiert und ist an den interzellulären Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und Endometrium beteiligt. Dabei konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Lymphozyten-Adhäsion an Endometriumzellen vom ICAM-1-Signalweg abhängt [VIGANÓ et al., 1994].

3.4.3 Fingolimod [FTY720]

FTY720, das auch unter dem Namen Fingolimod bekannt ist, ist ein S1P-Analogon, das von beiden Isoformen der SPHK phosphoryliert wird und mit den Rezeptoren S1PR1 und S1PR3-5 interagieren kann (Abb.5). Die Struktur des synthetisch hergestellten Wirkstoffs orientiert sich an der Struktur des Naturstoffs Myriocin aus dem Pilz *Isaria sinclairii* [FUJITA et al., 1994]. Das Analogon ist kein Substrat der S1P-Lyase und inhibiert sogar deren Aktivität [BANDHUVULA et al., 2005].

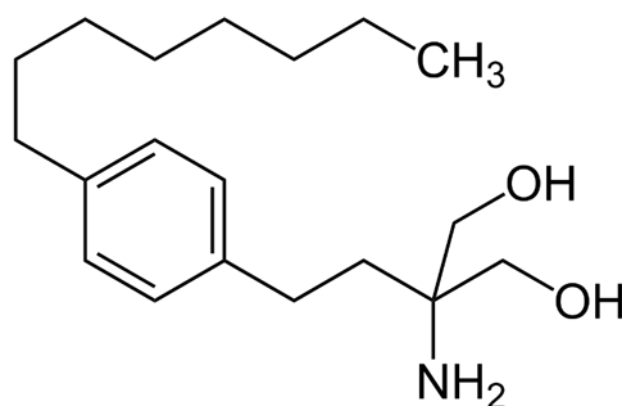


Abbildung 5: Strukturformel von Fingolimod [FTY720].

Der Wirkstoff wurde bereits in einer Vielzahl von Studien untersucht und wird seit Jahren aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung zur Therapie der Multiplen Sklerose (MS) eingesetzt. FTY720 hält die Lymphozyten in den Lymphknoten zurück und induziert somit eine Lymphopenie. Dadurch können weniger Lymphozyten zu den Nervenbahnen der an MS erkrankten Patienten gelangen [MATLOUBIAN et al., 2004]. Als Wirkmechanismus wird angenommen, dass FTY720 den S1PR1 auf den Lymphozyten internalisiert, degradiert und dadurch die Rezeptorbindung von S1P hemmt [CHIBA, 2005].

TAKASAKI et al. [2018] berichteten darüber, dass FTY720 neben einer immunsuppressiven auch eine anti-karzinogene Wirkung besitzt, da in Tumoren durch diesen Wirkstoff die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies die Apoptose ausgelöst wird. Im Unterschied zur immunsuppressiven Wirkung ist die anti-karzinogene Wirkung unabhängig von der Phosphorylierung von FTY720 [ZHANG et al., 2013].

Die anti-karzinogene Wirkung von FTY720 konnte bereits in verschiedenen Studien, z. B. bei Brustkrebs [AZUMA et al., 2002], Prostata- [CHUA et al., 2005], Lungen- [SCHMID et al., 2005] und Ovarialkrebs [ZHANG et al., 2010] nachgewiesen werden. SCHMID et al. [2005] konnten zeigen, dass FTY720 durch den funktionalen Antagonismus gegenüber vaskulären S1P-Rezeptoren einen starken anti-angiogenen Effekt hat. *In vitro* konnte mit FTY720 die Sprossung von durch VEGF stimulierten human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)-Sphäroiden inhibiert werden und auch *in vivo* konnte eine Hemmung der Angiogenese nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass durch die antagonistische Wirkung von FTY720 auf S1PR3 das endotheliale Sprouting signifikant um 45 % verringert wird [DAS et al., 2015]. Durch die Hemmung der tumorassoziierten Angiogenese und der damit verbundenen Reduktion der Mikrogefäßdichte konnte weiterhin das Größenwachstum von Tumoren supprimiert werden [LAMONTAGNE et al., 2006]. Der anti-angiogene Effekt von FTY720 kann mit dem Einfluss auf die Rezeptoren S1PR1 und S1PR3 erklärt werden, die auf Endothelzellen exprimiert werden [KONO et al., 2004]. Eine Hemmung dieser Rezeptoren kann zu Defekten bei der Bildung eines Gefäßnetzwerks führen [SHOHAM et al., 2012], weil der Rezeptor S1PR1 auch die Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen innerhalb eines Gefäßes vermittelt [ALLENDE und PROIA, 2002].

Die Ergebnisse aus den zuvor genannten Studien und dabei vor allem aus dem Bereich der Tumorforschung, lassen die Wirkstoffe SKI-5C, SEW2871 und FTY720 als sehr vielversprechend für eine mögliche neue Therapie der Endometriose erscheinen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht.

4 ZIELSTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war den Einfluss von SKI-5C, SEW2871 und FTY720 auf die Entwicklung von experimentell induzierten Endometrioseherden im Mausmodell zu analysieren. Außerdem sollte deren potentieller Einfluss auf die weiblichen Geschlechtsorgane untersucht werden. Dabei sollten die folgenden Hypothesen geprüft werden:

1. SKI-5C, SEW2871 und FTY720 haben eine anti-angiogene Wirkung auf induzierte murine Endometrioseherde.
2. Die genannten Substanzen inhibieren das Wachstum und die Proliferationsrate der Zellen von induzierten murinen Endometrioseherden.
3. SKI-5C, SEW2871 und FTY720 haben keinen negativen Einfluss auf die Morphologie, Vaskularisierung und Zellproliferation der Uteri und Ovarien der Versuchstiere.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Versuchstiere

Alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden an weiblichen BALB/c-Mäusen am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere hatten ein Alter von 12-20 Wochen und ein Gewicht von 18-25 g. Die Haltung der Tiere, die für das intraperitoneale Endometriosemodell eingesetzt wurden, erfolgte in Kleingruppen. Die Tiere mit Rückenhautkammer wurden in Einzelkäfigen untergebracht, um gegenseitige Verletzungen zu vermeiden. Die Haltung erfolgte unter klimatisierten Bedingungen und bei einem Tag/Nachtrhythmus von 12 h. Trinkwasser und pelletiertes Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Versuche wurden gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz in Saarbrücken genehmigt (Versuchsnummer: 32/2015).

5.2 Vaginale Zyklusbestimmung

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der durchgeführten Experimente durch verschiedene initiale Zyklusstadien der einzelnen Versuchstiere beeinflusst werden, erfolgte vor dem Beginn der Versuche eine Zyklusbestimmung mittels Vaginallavage. Dafür wurden 15 µl einer physiologischen Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Vagina der nicht narkotisierten Mäuse pipettiert. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde danach auf einen Objektträger transferiert und unter einem Phasenkontrastmikroskop (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Die Labormaus gehört zu den polyzyklischen Tieren, bei denen die vier Zyklusstadien Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus unterschieden werden [CALIGIONI, 2010]. Im Zeitraum des Proöstrus treten verstärkt Parabasalzellen und Intermediärzellen auf. Gegen Ende des Proöstrus steigt die Zahl der Intermediärzellen an und darüber hinaus sind auch Epithelzellen vorhanden. Typisch für den Östrus ist das Auftreten von großen und kernlosen Epithelzellen. Das Zyklusstadium des Metöstrus stellt sich als Mischbild dar, in dem Leukozyten, Epithelzellen und Intermediärzellen zu sehen sind. Im Diöstrus treten ausschließlich Leukozyten auf.

5.3 Gewinnung von Uterusgewebe

Für die chirurgische Induktion einer Endometriose im Mausmodell wurden Endometrium- bzw. Uterusfragmente von sich im Östrus befindenden Spendermäusen generiert und dann entweder in die Rückenhautkammer oder in die Bauchhöhle von Empfängerinnen transplantiert. Dafür wurden den Mäusen zur Entnahme der Uterushörner intraperitoneal Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht (KG); Ursotamin, Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland) injiziert. Nach der Fixierung der Mäuse in Rückenlage wurde die Bauchhaut mit Softasept N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und eine mediane Laparotomie durchgeführt. Zur Freilegung der beiden Uterushörner wurde der Darm ausgelagert. Unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden beide Uterushörner entnommen und die Spendermäuse danach durch die Eröffnung der unteren Hohlvene (*Vena cava caudalis*) getötet. Die entnommenen Uterushörner wurden in eine Petrischale überführt, die auf 37 °C erwärmtes Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 10 % fötales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) enthielt. Nach dem longitudinalen Eröffnen der Uterushörner wurden zunächst mit einer Mikroschere das Perimetrium und das Myometrium entfernt. Aus dem freigelegten Endometrium wurden dann einzelne Fragmente mit einem vergleichbaren Durchmesser von ca. 0,8 mm präpariert (Abb. 6A-C).

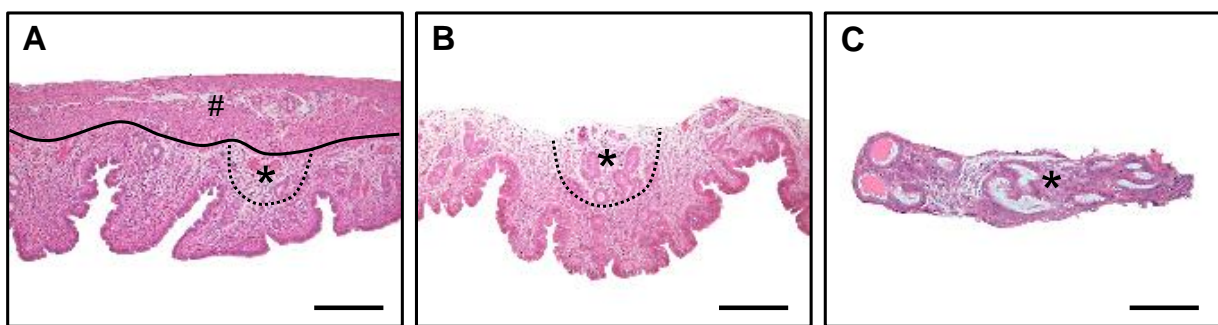


Abbildung 6: Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Gewebeschnitte, welche die Präparation von Endometriumfragmenten für die Transplantation in die Rückenhautkammer zeigen. Von den fixierten und longitudinal eröffneten Uterushörnern wurden zuerst mit mikrochirurgischen Instrumenten und unter einem Stereomikroskop das Perimetrium und das Myometrium (A: mit # gekennzeichnet; Linie = Grenze zu dem darunterliegenden Endometrium, Maßstab: 730 μ m) entfernt. Die kreisförmigen Gewebefragmente (A-C: mit * gekennzeichnet, Grenze mit gepunkteter Linie markiert, Maßstab: B = 570 μ m, C = 170 μ m), die nur aus endometrialem Stroma- und Drüsengewebe bestanden (C), wurden dann aus dem Endometrium abpräpariert.

Für das intraperitoneale Modell wurden nach dem Eröffnen der Uterushörner mit einer Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) 2 mm große Uterusfragmente, die aus Endometrium, Myometrium und Perimetrium bestanden, gewonnen und ebenfalls in eine mit DMEM gefüllte Petrischale transferiert (Abb. 7).

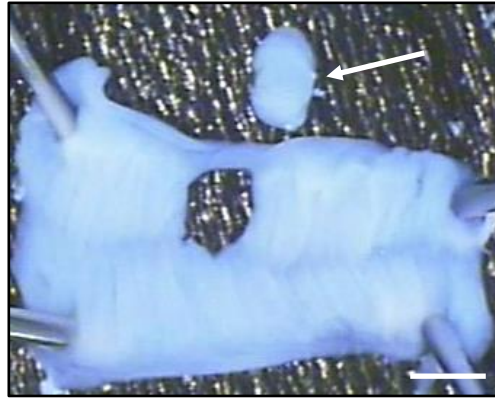


Abbildung 7: Längs eröffnetes Uterushorn einer BALB/c Spendermaus mit einer 2 mm Gewebestanze (Pfeil), Maßstab= 2,5 mm.

5.4 Modell der Rückenhautkammer

5.4.1 Präparation der Rückenhautkammer

Für die Implantation der Rückenhautkammer wurden die Mäuse zunächst mit einer intraperitonealen Injektion mit Ketamin (75 mg/kg KG; Ursotamin, Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun, Bayer) anästhesiert. Danach wurde das Fell mit einem elektrischen Rasierer (ISIS GT 420; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) geschoren, um dann die Haut mit einer Enthaarungscreme zu depilieren (ASID-med Enthaarungscreme; ASID Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland). Die Cremereste wurden mit lauwarmem Leitungswasser abgewaschen und die gereinigte Haut wurde desinfiziert (Softasept N, B. Braun Melsungen AG). Um die Cornea vor dem Austrocknen unter der Narkose zu schützen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen, Augen- und Nasensalbe; Bayer) aufgebracht. Mit einer Gegenlichtlampe wurde der Gefäßverlauf der Rückenhaut dargestellt und diese mit zwei Haltefäden an einem Stativ fixiert (Abb. 8A). Der erste Rahmen der Titankammer wurde an der abgewandten Rückenhautfalte befestigt, wobei eine Verletzung der Blutgefäße vermieden wurde. Durch zwei kleine Inzisionen an der Basis der Rückenhautfalte konnten die Verbindungsschrauben der Kammer durch die Hautschichten geschoben werden (Abb. 8B). Danach wurde unter Gegenlicht das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer eingezeichnet, um dann

die Maus in seitlicher Position auf einer Plexiglasbühne zu fixieren (Abb. 8C). Unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) wurden nun an der zugewandten Hautseite im Bereich des Beobachtungsfensters die Cutis, die Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel (*M. panniculus carnosus*) und die beiden Schichten des *M. retractor* mit Fettgewebe vorsichtig exzidiert. Dabei wurde das frei präparierte Gewebe immer wieder mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und befeuchtet. Danach wurde der zweite Rahmen der Rückenhautkammer vorsichtig aufgesetzt und mit Distanzmuttern befestigt, welche zudem eine Kompression des Gewebes zwischen den beiden Rahmen verhinderten. Zum Schluss wurde das Beobachtungsfenster mit einem Deckglas unter Vermeidung von Lufteinschlüssen abgedeckt und mit einem Sprengring fixiert (Abb. 8D). Im Anschluss konnten sich die Tiere 48 Stunden von der Operation erholen.

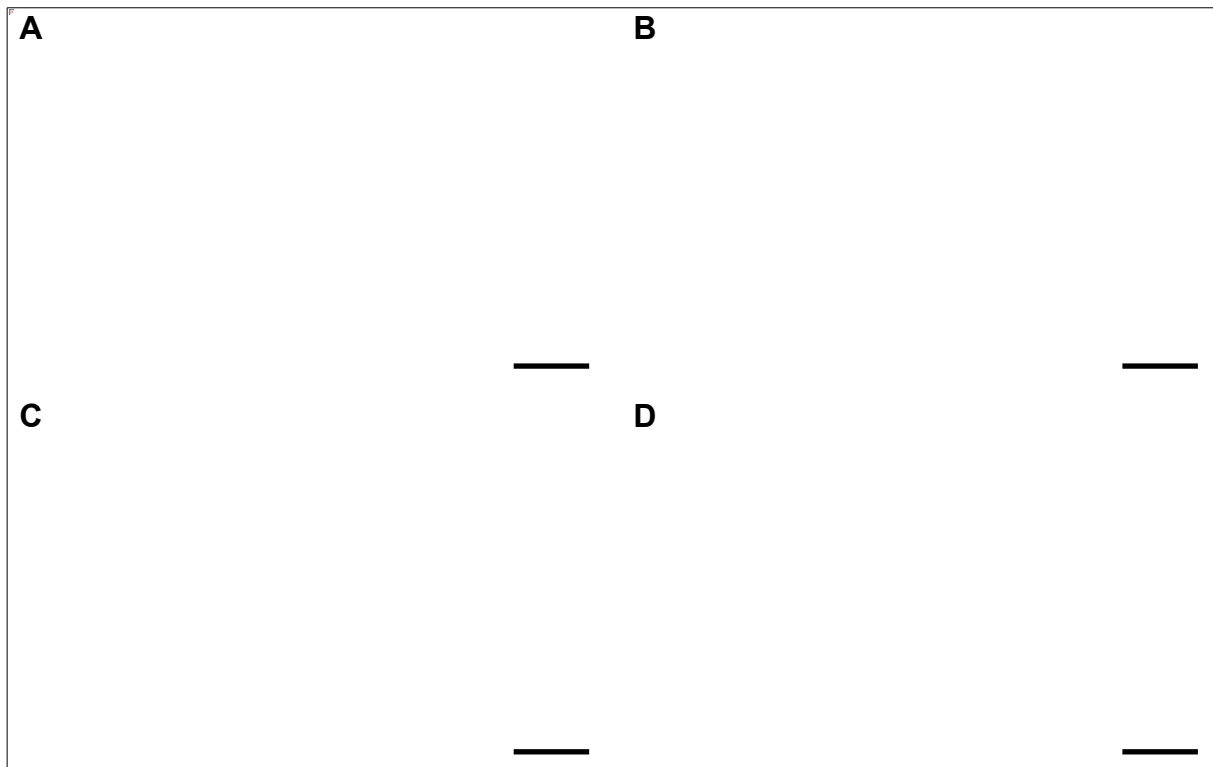


Abbildung 8: Präparation der Rückenhautkammer bei einer anästhesierten BALB/c Maus. **A:** Anbringen der Haltefäden unter Gegenlicht (Maßstab = 1,7 cm), **B:** Fixierung des hinteren Rahmens der Rückenhautkammer (Maßstab = 1,2 cm), **C:** Eingezeichnetes Beobachtungsfenster bei einer Maus in Seitenlage (Maßstab = 0,8 cm), **D:** Rückenhautkammer in situ (Maßstab = 1,4 cm).

5.4.2 Transplantation der Endometriumfragmente

Nach einer Erholungsphase von 48 h nach der Implantation der Rückenhautkammer wurden die Endometriumfragmente aus den Spendertieren entnommen, wie unter 5.3

beschrieben. Für die Transplantation der Endometriumfragmente wurden die Empfängertiere erneut narkotisiert und auf einer Plexiglasbühne fixiert, sodass das Deckglas des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer vorsichtig entfernt werden konnte. Das Kammergewebe wurde mit Kochsalzlösung gespült. Danach erfolgte die Transplantation von zwei Endometriumfragmenten ($d = 0,8$ mm), die mit ausreichendem Abstand sowohl zueinander als auch zur äußeren Begrenzung zentral in das Beobachtungsfenster positioniert wurden. Dadurch sollte verhindert werden, dass die beiden Transplantate miteinander verwachsen oder sich außerhalb des Beobachtungsfensters entwickeln. Das Beobachtungsfenster wurde dann wieder vorsichtig zur Vermeidung von Lufteinschlüssen mit einem Deckglas abgedeckt und mit dem Sprengring verschlossen.

5.4.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Im Rückenhautkammermodell wurden die Größe und Vaskularisierung der Endometriumfragmente am Tag der Transplantation (Tag 0) und an den Tagen 3, 6, 10 und 14 mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dafür erhielten die Tiere eine Injektionsnarkose mit Ketamin (75 mg/kg KG; Ursotamin, Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun, Bayer) und wurden danach mit der Rückenhautkammer in Seitenlage auf einer Plexiglasbühne fixiert. Anschließend wurde den Mäusen zur Kontrastierung des Gefäßsystems retrobulbär der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran 5 %, 0,05 ml, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA) injiziert. Mit einem modifizierten Zeiss-Axiotech-Mikroskop (Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland), das mit 5x, 10x und 20x Objektiven (Zeiss), einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampflampe und einem im Strahlengang eingebrachten Blaufilter (450-490 nm Erregungs- / $>$ 580 nm Emissionswellenlänge) ausgestattet war, konnten Aufnahmen der sich entwickelnden Endometrioseherde angefertigt werden. Eine CCD-Videokamera (FK6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) übertrug die dargestellten Bilder in einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde auf einen DVD-Rekorder (DVD-R121, Samsung, Schwalbach, Deutschland), wodurch sie auf einem Bildschirm (KV-14 CT1E; Sony, Tokyo, Japan) dargestellt werden konnten. Die Auswertung der auf DVD übertragenen *in vivo* Mikroskopaufnahmen erfolgte nach dem Abschluss der Versuche mit dem Bildverarbeitungssystem CapImage (Version 8.5, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland).

Durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie konnten die folgenden Parameter erfasst werden:

- a) Größe der Endometrioseherde: Am Computerbildschirm konnte die Gesamtfläche jedes einzelnen Endometrioseherdes ausgemessen werden (in mm²).
- b) Funktionelle Mikrogefäßdichte: Sie gibt die Länge der von Erythrozyten perfundierten Gefäße pro Fläche an. Dafür wurde von jedem Transplantat die Gesamtfläche bestimmt und anschließend wurde am Computerbildschirm die Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße in diesem Bereich gemessen. Die funktionelle Mikrogefäßdichte wurde anschließend als Quotient aus der Gesamtlänge der Gefäße und der Fläche des Transplantats (in cm/cm²) berechnet.
- c) Gefäßdurchmesser: Dafür wurde eine Folie mit aufgezeichnetem Achsenkreuz an den Computerbildschirm angebracht, um dann bei denjenigen Gefäßen, welche die vertikale oder horizontale Achse kreuzten, den Durchmesser (in µm) zu messen.
- d) Zentrale Blutzellgeschwindigkeit: Für die Erfassung der zentralen Blutzellgeschwindigkeit wurde die computergestützte Line-Shift-Diagramm-Methode angewandt [KLYSCZ et al., 1997]. Dafür wurde am Computerbildschirm zentral innerhalb eines Gefäßlumens entlang des Gefäßverlaufs eine Messlinie gezogen, wobei die Blutgefäße mit bereits zuvor erfassten Gefäßdurchmessern verwendet wurden. Erythrozyten, welche die Messlinie passierten, wurden im Line-Shift-Diagramm als dunkle Linien und Plasmalücken als weiße, schrägverlaufende Linien dargestellt. Anhand der Steigung dieser Linien konnte das Bildverarbeitungssystem die Blutzellgeschwindigkeit im Gefäßlumen (in µm/s) berechnen.
- e) Volumetrischer Blutfluss: Der volumetrische Blutfluss (in pl/s) wurde wie folgt anhand der Blutzellgeschwindigkeit (V_{RBC}) und des Durchmessers (d) des entsprechenden Gefäßes berechnet:

$$\text{Volumetrischer Blutfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times V_{RBC}/K,$$

wobei K (1,3) dem Baker/Wayland-Faktor entspricht, der das parabolische Geschwindigkeitsprofil von Blut in Mikrogefäßen berücksichtigt [LASCHKE et al., 2011].

5.4.4 Entnahme der Endometriumfragmente, Ovarien und Uteri

Nach dem Abschluss des 14-tägigen Versuchszeitraums wurden die Versuchstiere durch Ausbluten euthanasiert. Vorher wurden die Endometrioseherde in der Rückenhautkammer, die Uteri und Ovarien der Tiere entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach 24 h erfolgte die Einbettung der Gewebe in Paraffin und die Anfertigung von 3 µm-dicken Serienschnitten mit einem Mikrotom (Cut 5062; SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland). Danach wurden die Schnitte für weiterführende histologische und immunhistochemische Untersuchungen aufbewahrt.

5.5 Modell der intraperitonealen Endometriose

5.5.1 Transplantation der Uterusstanzen

Die aus den Spendertieren gewonnenen Uterusstanzen wurden für die Induktion peritonealer Endometrioseherde in die Bauchhöhle von Empfängermäusen transplantiert, die sich alle im Stadium des Östrus befanden. Dafür wurden die Empfängermäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin (75 mg/kg KG; Ursotamin, Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun, Bayer) narkotisiert. Das Fell im Bauchbereich wurde dann mit einer Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp., Mississauga, ON, Kanada) entfernt, die Bauchdecke anschließend mit lauwarmem Wasser abgespült und mit Softasept (B. Braun Melsungen AG) desinfiziert.

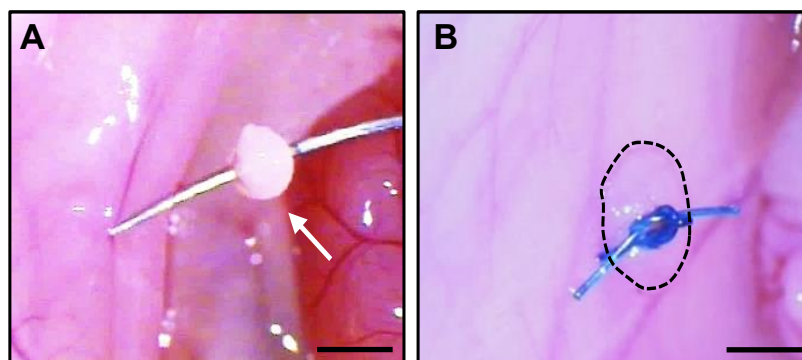


Abbildung 9: Fixierung von Uterusstanzen an der Bauchwand einer BALB/c Empfängermaus zur Induktion von peritonealen Endometrioseherden. **A:** Uterusstanze auf der Nadel (Pfeil, Maßstab = 2 mm), **B:** Typisches Aussehen eines Transplantats (gestrichelte Linie) direkt nach der Fixierung mit einem Prolene-Faden (Maßstab = 2 mm).

Nach einer Laparotomie wurden die gewonnenen Uterusstanzen an die laterale Bauchwand (beidseits je zwei Uterusstanzen) mit einem 6-0 Prolene-Faden (Ethicon Produkte, Norderstedt, Deutschland) am Peritoneum fixiert (Abb. 9A und B). Abschließend wurde die Muskel- und Hautschicht der Bauchdecke jeweils mit einer fortlaufenden Naht mit einem 6-0 Prolene-Faden (Ethicon Produkte) wieder verschlossen.

5.5.2 Hochauflösende Ultraschall-Bildgebung

Nach dem Versuchsprotokoll wurde für das intraperitoneale Mausmodell sowohl am Tag der Transplantation der Uterusstanzen als auch an den Tagen 7, 14, 21 und 28 eine Volumenmessung der Endometrioseherde mit einem hochauflösenden Ultraschallsystem (Vevo770, Visual Sonics, Toronto, Kanada) durchgeführt. Dafür wurden die Mäuse initial in einer Plexiglasbox mit 5 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland) narkotisiert, um sie dann in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch zu fixieren. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der Ultraschallaufnahmen erhielten die Tiere über eine Atemmaske durchgehend 2 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH). Danach konnte das Abdomen der Tiere enthaart und das Ultraschallgel (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) aufgetragen werden. Der Ultraschallkopf (704 RMV; Visual Sonics) wurde entlang der Bauchwand geführt und fertigte zweidimensionale Schnittbilder in einem Abstand von 50 μm mit einer Fokustiefe von 6 mm und einer Frequenz von 40 MHz an (Abb. 10).



Abbildung 10: Ultraschall-Bildgebung an einer BALB/c-Maus. Der 40 MHz-Ultraschallkopf ist mit einem Pfeil markiert (Maßstab = 2,3 cm).

Mit einer speziellen Software (Vevo 770 V2.3.0, VisualSonics) wurden aus den Aufnahmen dreidimensionale Bilder erstellt. Die quantitative Analyse der gewonnenen Ultraschallbilder umfasste das Gesamt-, Stroma- und Zystenvolumen der Endometrioseherde (in mm³). Aus diesen Daten wurden, wie unter 5.7.1 beschrieben, Aussagen über das Wachstum der Endometrioseherde (in %) und des Stromas (in %) und über den prozentualen Anteil von Zysten enthaltenden Herden (in %) abgeleitet.

5.5.3 Messung mit digitalem Messschieber

Im intraperitonealen Mausmodell wurde zusätzlich an Tag 28 eine zweidimensionale Vermessung der Endometrioseherde mit einem digitalen Messschieber (0-150 mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Gabe von Ketamin (75 mg/kg KG; Ursotamin, Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Durch einen Längsschnitt entlang der *Linea alba* konnten der Bauchraum eröffnet und die Endometrioseherde gut dargestellt werden. Der Quer (d1) - und Längsdurchmesser (d2) der Herde wurde mit dem digitalen Messschieber unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) ermittelt. Anhand der erhaltenen Werte wurde die Größe (in mm²) der Herde mit der folgenden Formel berechnet: $d1 \cdot d2 \cdot \pi / 4$, wobei für d1 der kürzere und für d2 der längere und senkrecht dazu verlaufende Durchmesser eingesetzt wurde [BECKER et al., 2008]. Nach der digitalen Vermessung wurden die narkotisierten Mäuse durch Ausbluten getötet.

5.5.4 Entnahme der Endometrioseherde, Ovarien und Uteri

Nach dem Abschluss des 7- bzw. 28-tägigen Versuchszeitraums wurden die Versuchstiere durch Ausbluten euthanasiert. Vorher wurden die Endometrioseherde, die Ovarien und Uteri der Tiere entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Nach 24 Stunden erfolgten die Einbettung der Gewebe in Paraffin und die Anfertigung von 3 µm-dicken Serienschnitten mit einem Mikrotom (Cut 5062; SLEE medical GmbH). Danach wurden die Schnitte für weiterführende histologische und immunhistochemische Untersuchungen aufbewahrt.

5.6 Histologie und Immunhistochemie

5.6.1 HE-Färbung

Nach der Anfertigung von 3 µm-dicken Serienschnitten von den entnommenen Endometrioseherden, Ovarien und Uteri wurde jeder 10. Schnitt nach Standardprotokoll mit HE gefärbt. Dabei färbt Hämatoxylin alle Strukturen, die basophil sind, wie z. B. Zellkerne, blau und Eosin färbt alle Strukturen, die acidophil sind, z. B. Plasmaproteine, rot an. Aus den Serienschnitten wurden repräsentative Schnitte für nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen (Ki67 und CD31) unter einem Mikroskop (BX-60, Olympus) ausgewählt.

5.6.2 Ki67-Färbung

Ki67 wurde als Proliferationsmarker eingesetzt. Dieses Antigen wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M-Phase) exprimiert, fehlt aber in ruhenden Zellen (G0-Phase) [JOHNSON et al., 2005]. Deshalb können mit einer Ki67-Färbung alle proliferierenden Zellen identifiziert werden. Außerdem ist eine gute Korrelation zwischen Ki67 und der Mitoserate im humanen Endometrium belegt, sodass diese Färbung einen verlässlichen Parameter zur Erfassung der Zellproliferation in diesem Gewebe darstellt [JOHNSON et al., 2005]. Als Primärantikörper für die Detektion von Ki67-positiven Zellen wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-Ki67 Antikörper (1:500; Abcam, Cambridge, England) eingesetzt. Als korrespondierender Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (ready to use; Abcam). Als Chromogen wurde Diaminobenzidin verwendet. Die hinzugegebene Avidin-Peroxidase (ready-to-use; Abcam) führte zu einer Farbreaktion. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Proliferationsrate (in %) wurde unter einem Mikroskop (BX-60; Olympus) durch das Zählen von positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in vier Regionen innerhalb eines Endometrioseherdes ermittelt.

5.6.3 CD31-Färbung

Durch die Immunfluoreszenzfärbung von CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule; PECAM-1) konnte die Blutgefäßdichte in den untersuchten Geweben ermittelt werden. CD31 ist ein Transmembranprotein, das in Gefäßendothelien exprimiert

wird. Als Primärantikörper wurde ein Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:100; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und als Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Ratte-Alexa-Indocarbocyanin-Antikörper (1:200; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Außerdem wurden die Schnitte mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) behandelt, um die Zellkerne anzufärben. Die fertigen Schnitte wurden zur quantitativen Auswertung der Blutgefäßdichte (in mm⁻²) unter einem BZ-8000 Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Osaka, Japan) untersucht. Um die Gefäßdichte zu berechnen, wurde die Anzahl aller CD31-positiven Mikrogefäße innerhalb des zu untersuchenden Gewebes gezählt und durch die Gewebefläche geteilt.

5.7 Experimentelles Protokoll

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von SKI-5C, SEW2871 und FTY720 auf den S1P-Signalweg und die damit verbundene Wirkung auf das Wachstum und die Angiogenese von induzierten Endometrioseherden untersucht.

5.7.1 SKI-5C

Um den Einfluss von SKI-5C auf das Wachstum und die Angiogenese von experimentell induzierten Endometrioseherden zu analysieren, wurden aus 4 BALB/c Spendermäusen insgesamt 24 Endometriumfragmente in 12 Rückenhautkammern von 6 Behandlungs- und 6 Kontrolltieren transplantiert. Die Transplantation erfolgte randomisiert. Alle Mäuse befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Östrus (Tag 0). Ab dem Tag der Transplantation der Endometriumfragmente erfolgte einmal täglich über 14 Tage die intraperitoneale Applikation von SKI-5C in einer Dosierung von 10 mg/kg KG, während den Kontrolltieren 0,1 ml des Vehikels Maiskeimöl appliziert wurde. Die Dosis von 10 mg/kg KG SKI-5C wurde bereits in einer Studie zur Therapie gegen Brustkrebs eingesetzt [DATTA et al., 2014]. Dabei konnte gezeigt werden, dass SKI-5C die Zellproliferation reduziert, die Apoptose der Brustkrebszellen stimuliert und dadurch die Größe sich entwickelnder Tumore vermindert. Ähnliche Ergebnisse konnten bei einer Studie erzielt werden, bei der 2-mal wöchentlich 20 oder 40 mg/kg KG über 5 Wochen SKI-5C zur Behandlung von Nephroblastomen eingesetzt wurde [LI et al., 2016].

Für die Analyse der sich entwickelnden Endometrioseherde wurde an den Tagen 0 (Tag der Transplantation), 3, 6, 10 und 14 eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Auf diese Weise konnten an den jeweiligen Untersuchungstagen die

Größe und die funktionelle Mikrogefäßdichte der Endometrioseherde sowie der Durchmesser, die zentrale Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss in ausgewählten Gefäßen (siehe Abschnitt 5.4.3) ermittelt werden. Am Ende des Experiments wurden die Tiere ausgeblutet und die Endometrioseherde, Ovarien und Uteri für immunhistochemische Untersuchungen exzidiert.

Außerdem wurde SKI-5C in einem zweiten Schritt in einem intraperitonealen Endometriosemodell getestet, das mit 7 Tieren in der Behandlungsgruppe und 8 Tieren in der Kontrollgruppe durchgeführt wurde. Dabei wurden an Tag 0 insgesamt 60 Uterusstanzen von 4 BALB/c Spendermäusen entnommen und randomisiert auf das Peritoneum von 15 Empfängertieren transplantiert. Dazu wurden jeweils zwei Uterusfragmente an der rechten und linken Seite der Bauchwand fixiert, sodass jeder Empfängermaus 4 Uterusfragmente implantiert wurden. Alle Mäuse befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Östrus (Tag 0). Die Applikation erfolgte ab Tag 0 ebenfalls täglich durch eine intraperitoneale Injektion von 10 mg/kg KG SKI-5C (Behandlungsgruppe) bzw. 0,1 ml Maiskeimöl (Kontrollgruppe) über 28 Tage. An den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 wurde die sonographische Untersuchung der Endometrioseherde durchgeführt. Am 28. Tag wurden die Herde zusätzlich mit einem digitalen Messschieber vermessen. Durch den hochauflösenden Ultraschall und den digitalen Messschieber konnten die folgenden Parameter ermittelt werden:

1. Größe der Endometrioseherde (in mm^2)
2. Gesamtvolumen der Herde (in mm^3)
3. Stromavolumen der Herde (in mm^3)
4. Zystenvolumen der Herde (in mm^3)
5. Wachstumsrate der Endometrioseherde (in %) = $\frac{\text{Gesamtvolumen am Tag X}}{\text{Gesamtvolumen am Tag 0}} * 100 - 100$
6. Wachstumsrate des Stromagewebes (in %) = $\frac{\text{Stromavolumen am Tag X}}{\text{Stromavolumen am Tag 0}} * 100 - 100$
7. Prozentualer Anteil der Herde mit Zysten pro Tier (in %) = $\frac{\text{Anzahl der Zysten enthaltenden Herde}}{\text{Gesamtzahl der Herde}} * 100$

In einem weiteren Experiment wurden Endometrioseherde induziert, welche nach 7 Tagen für immunhistochemische Untersuchungen herangezogen wurden. Sonogra-

phische Untersuchungen sowie die Vermessung mit einem digitalen Messschieber fanden in diesem Experiment nicht statt. Hierzu wurden aus 4 BALB/c Spendermäusen insgesamt 68 Uterusstanzen (4 Uterusstanzen pro Empfängertier) in 9 Behandlungs- und 8 Kontrolltiere transplantiert. An Tag 0 befanden sich sowohl die Spendermäuse als auch die Empfängermäuse im Östrus. Die Applikation erfolgte ab Tag 0 ebenfalls täglich mittels intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg KG SKI-5C (Behandlungsgruppe) bzw. 0,1 ml Maiskeimöl (Kontrollgruppe) über 7 Tage. Am Versuchsende wurden die Mäuse unter Narkose durch Ausbluten getötet.

Am Ende eines jeden Experiments wurden die Endometrioseherde, Ovarien und Uteri der Versuchstiere entnommen und in 4%igem Formaldehyd für anschließende immunhistochemische Analysen fixiert. Zunächst wurde für eine morphologische Begutachtung eine HE-Färbung angefertigt. Nach der Färbung der histologischen Schnitte mit dem Endothelzellmarker CD31 konnte in den Endometrioseherden und in den Ovarien und Uteri die Blutgefäßdichte (in mm^{-2}) ermittelt werden. Durch die Verwendung des Proliferationsmarkers Ki67 konnte die Proliferationsrate (in %) in den Herden und in den Ovarien und Uteri bestimmt werden. In den Endometrioseherden wurden Ki67-positive Zellen sowohl im Stroma als auch in den Drüsen gezählt und als prozentualen Anteil an der jeweiligen Gesamtzellzahl angegeben.

5.7.2 SEW2871

Um den Einfluss von SEW2871 auf das Wachstum und die Angiogenese von experimentell induzierten Endometrioseherden zu analysieren, wurden aus 4 BALB/c Spendermäusen insgesamt 24 Endometriumfragmente in 12 Rückenhautkammern von 6 Behandlungs- und 6 Kontrolltieren transplantiert. Die Transplantation erfolgte randomisiert. Alle Mäuse befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Östrus (Tag 0). Ab dem Tag der Transplantation der Endometriumfragmente erfolgte einmal täglich über 14 Tage die orale Applikation von SEW2871 per Schlundsonde in einer Dosierung von 10 mg/kg KG, während den Kontrolltieren 0,1 ml des Vehikels 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) appliziert wurden.

Hintergrund dieser Dosierung ist die Studie von SOLEIMANI et al. [2011], in der durch eine intravenöse Gabe von 5 mg/kg KG SEW2817 eine Reduktion der Gefäßdichte in humanen ovariellen Xenotransplantaten gezeigt werden konnte. Durch die gewählte orale Applikationsroute kann ein signifikanter Wirkstoffanteil im Darm und in der Leber

metabolisiert werden. Dadurch reduziert sich die Menge an SEW2871, die den systemischen Kreislauf erreicht, weshalb die Dosis auf 10 mg/kg KG erhöht wurde.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die immunhistochemischen Auswertungen und die Berechnung aller Parameter in den Endometrioseherden, Ovarien und Uteri wurden so durchgeführt, wie bereits unter 5.7.1 für das Rückenhautkammermodell angegeben.

5.7.3 FTY720

Um den Einfluss von FTY720 auf das Wachstum und die Angiogenese von experimentell induzierten Endometrioseherden zu analysieren, wurden aus 4 BALB/c Spendermäusen insgesamt 24 Endometriumfragmente in 12 Rückenhautkammern von 6 Behandlungs- und 6 Kontrolltieren transplantiert. Die Transplantation erfolgte randomisiert. Alle Mäuse befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Östrus (Tag 0). Ab dem Tag der Transplantation der Endometriumfragmente erfolgte einmal täglich über 14 Tage die intraperitoneale Applikation von FTY720 in einer Dosierung von 10 mg/kg KG, während den Kontrolltieren 0,1 ml des Vehikels phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) appliziert wurden.

Diese Dosierung wurde bereits mehrfach erfolgreich in Antitumorstudien eingesetzt. So konnte bei Prostata-CWR22R-Xenotransplantaten in Nacktmäusen die tägliche intraperitoneale Gabe von 10 mg/kg KG FTY720 das Tumorstadium durch eine verringerte Proliferationsrate und eine Hemmung von angiogenen Faktoren reduziert werden [CHUA et al., 2005].

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die immunhistochemischen Auswertungen und die Berechnung aller Parameter in den Endometrioseherden, Ovarien und Uteri wurden so durchgeführt, wie bereits unter 5.7.1 für das Rückenhautkammermodell angegeben.

5.7.4 Statistik

Die deskriptive Statistik wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2019 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) erstellt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels Graph Pad Prism (Version 9.3.0, Graph Pad, San Diego, CA, USA). Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Software-Paket SigmaStat (Version 2.03; Jandel Scientific, San Jose, CA, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die Daten mit einem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung

geprüft. Beim Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen mit dem Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Wenn keine Normalverteilung der Werte vorlag, wurde ein Mann-Whitney-U-Test eingesetzt.

Für normalverteilte Daten wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen für die Ermittlung von zeitabhängigen Unterschieden innerhalb einer Gruppe durchgeführt. Für nicht normalverteilte Daten wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen nach Friedman angewendet. Für die Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni wurde ein Student-Newman-Keuls post-hoc Test eingesetzt. Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angesehen. Die Angabe der Werte erfolgte als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (Mittelwert \pm SEM).

6 ERGEBNISSE

6.1 Einfluss von SKI-5C auf Endometrioseherde

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von SKI-5C auf das Wachstum und die Vaskularisierung von induzierten Endometrioseherden im Rücken-hautkammermodell und im intraperitonealen Endometriosemodell untersucht. Die da-für gewählte Dosierung von 10 mg/kg KG SKI-5C führte nicht zu toxischen Nebenwir-kungen. Der Allgemeinzustand der behandelten Tiere sowie ihr Schlaf-, Putz- und Fressverhalten waren unauffällig.

6.1.1 Endometrioseherde im Rückenhautkammermodell

6.1.1.1 Wachstum und Vaskularisierung der Endometrioseherde

In der ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung von SKI-5C auf die Gefäßnetzwerkbil-dung in Endometrioseherden im Modell der Rückenhautkammer analysiert. Die repe-titive intravitalmikroskopische Analyse der Herde ermöglichte eine genaue Beurteilung von morphologischen und mikrohämodynamischen Parametern, wie des Durchmes-sers und der zentralen Blutzellgeschwindigkeit von Mikrogefäßen. Außerdem wurde die Größe der Herde über einen Zeitraum von 14 Tagen planimetrisch gemessen (Abb. 11A und B).

An Tag 0 hatten die transplantierten Endometriumfragmente der Behandlungs- und Kontrollgruppe eine vergleichbare Initialgröße von $\sim 0,8 \text{ mm}^2$. Die intravitale fluo-reszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass die Behandlung mit SKI-5C das Wachstum der Endometrioseherde in der Rückenhautkammer innerhalb des Versuchszeitraums signifikant hemmte. Die Endometrioseherde der Kontrollgruppe waren an Tag 14 mit $\sim 1,4 \text{ mm}^2$ deutlich größer als die der SKI-5C-behandelten Gruppe mit einer terminalen Größe von $\sim 0,7 \text{ mm}^2$ (Abb. 11C).

Die Analyse der funktionellen Mikrogefäßdichte bestätigte an Tag 0 direkt nach der Transplantation, dass die Endometrioseherde beider Gruppen noch keine perfundier-ten Gefäße enthielten. An Tag 3 zeigte sich, dass die induzierten Endometrioseherde der Behandlungs- und Kontrollgruppe zunächst ein vergleichbares Gefäßnetzwerk ausgebildet hatten (Abb. 11D).

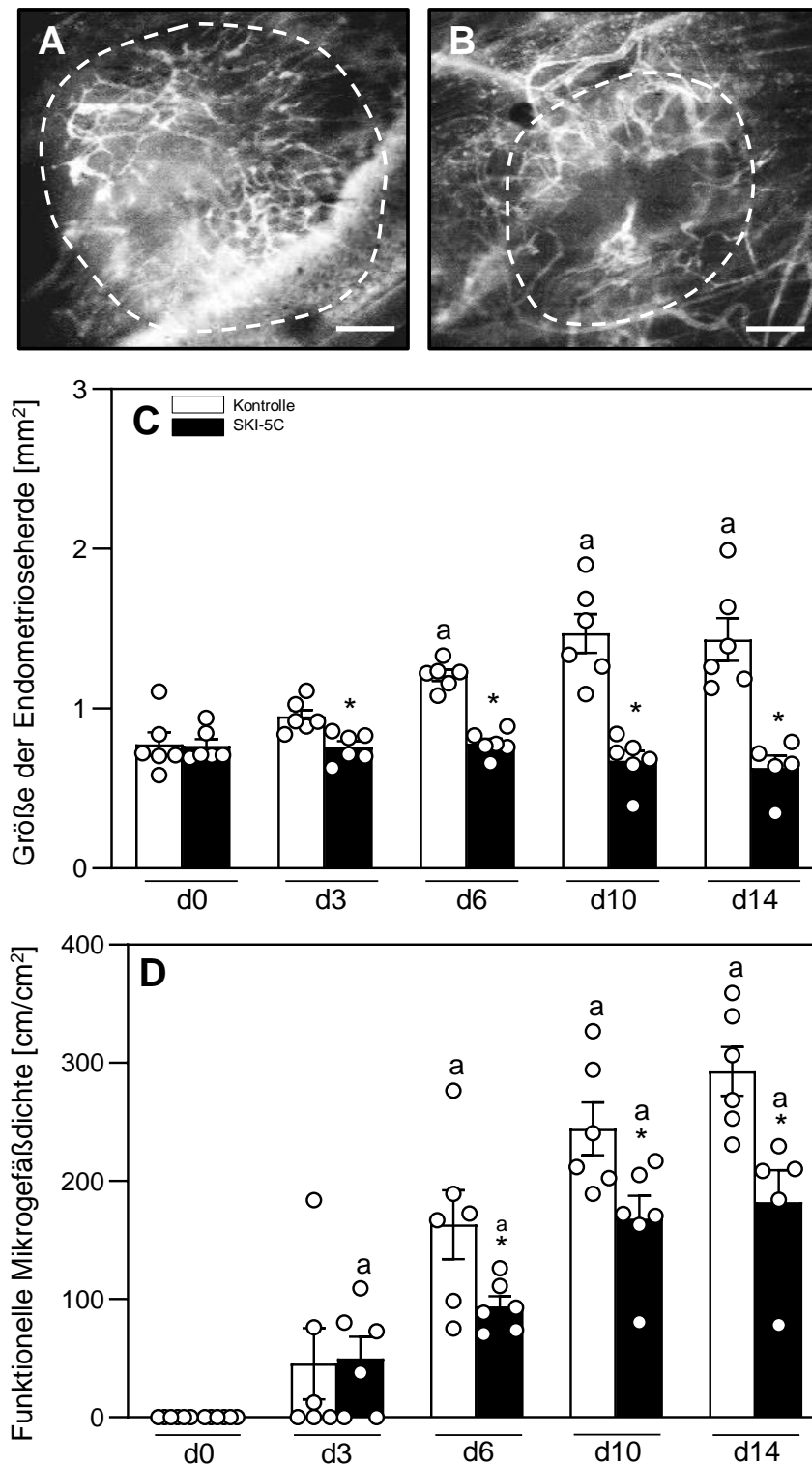


Abbildung 11: **A, B:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des Blutgefäßnetzwerks von Endometrioseherden an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer SKI-5C-behandelten BALB/c Maus (**B**) nach retrobulbärer Injektion von 5% FITC-Dextran. Die Grenzen der Herde sind durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet. Maßstab = 225 μ m. **C, D:** Größe (in mm², **C**) und funktionelle Mikrogefäßdichte (in cm/cm², **D**) von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 6) und SKI-5C-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 6). Mittelwert \pm SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle, ^ap < 0,05 vs. d0 der jeweiligen Gruppe.

Während bei der Kontrollgruppe eine Zunahme der funktionellen Mikrogefäßdichte bis zum Tag 14 nachgewiesen werden konnte ($\sim 285 \text{ cm/cm}^2$), zeigten die Endometrioseherde der Behandlungsgruppe eine signifikant geringere Dichte ($\sim 175 \text{ cm/cm}^2$; Abb. 11D). Darüber hinaus wiesen die Mikrogefäße der SKI-5C-behandelten Endometrioseherde an Tag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlich kleineren Durchmesser auf (Tab. 1). Die zentrale Blutzellgeschwindigkeit war in beiden Gruppen vergleichbar. Entsprechend konnte zwischen Tag 6 und 14 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein reduzierter volumetrischer Blutfluss errechnet werden, welcher nur an Tag 10 statistisch signifikant war.

Tabelle 1: Durchmesser (in μm), zentrale Blutzellgeschwindigkeit (in $\mu\text{m/s}$) und volumetrischer Blutfluss (in pl/s) von Mikrogefäßen in Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, $n = 6$) und SKI-5C-behandelten BALB/c Mäusen ($n = 6$). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ^a $p < 0,05$ vs. d3 der jeweiligen Gruppe.

	d0	d3	d6	d10	d14
Durchmesser (μm)					
Kontrolle	-	16,8 \pm 1,2	15,4 \pm 0,6	16,0 \pm 1,2	15,1 \pm 0,9 ^a
SKI-5C	-	18,4 \pm 0,4	15,0 \pm 1,0 ^a	12,6 \pm 0,7 ^{a*}	12,8 \pm 1,2 ^a
Zentrale Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)					
Kontrolle	-	122,1 \pm 19,5	223,3 \pm 43,0	187,8 \pm 39,3	180,5 \pm 32,4
SKI-5C	-	112,3 \pm 41,0	103,0 \pm 17,5	158,3 \pm 29,8	176,4 \pm 39,0
Volumetrischer Blutfluss (pl/s)					
Kontrolle	-	20,1 \pm 3,5	28,1 \pm 4,9	30,3 \pm 6,4	25,8 \pm 7,8
SKI-5C	-	23,0 \pm 8,7	14,4 \pm 3,1	15,6 \pm 3,4 [*]	17,5 \pm 4,6

Zusammenfassend zeigen diese intravitalen fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse, dass die Behandlung mit SKI-5C das Wachstum und die Vaskularisierung von sich neu entwickelnden Endometrioseherden in der Rückenhautkammer hemmt.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde in einer weiteren Versuchsreihe SKI-5C zusätzlich noch im intraperitonealen Endometriosemodell untersucht.

6.1.2 Endometrioseherde im intraperitonealen Modell

6.1.2.1 Wachstum der Endometrioseherde

Die Entwicklung intraperitonealer Endometrioseherde konnte mittels repetitiver hochauflösender Ultraschall-Bildgebung über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen analysiert werden (Abb. 12A und B).

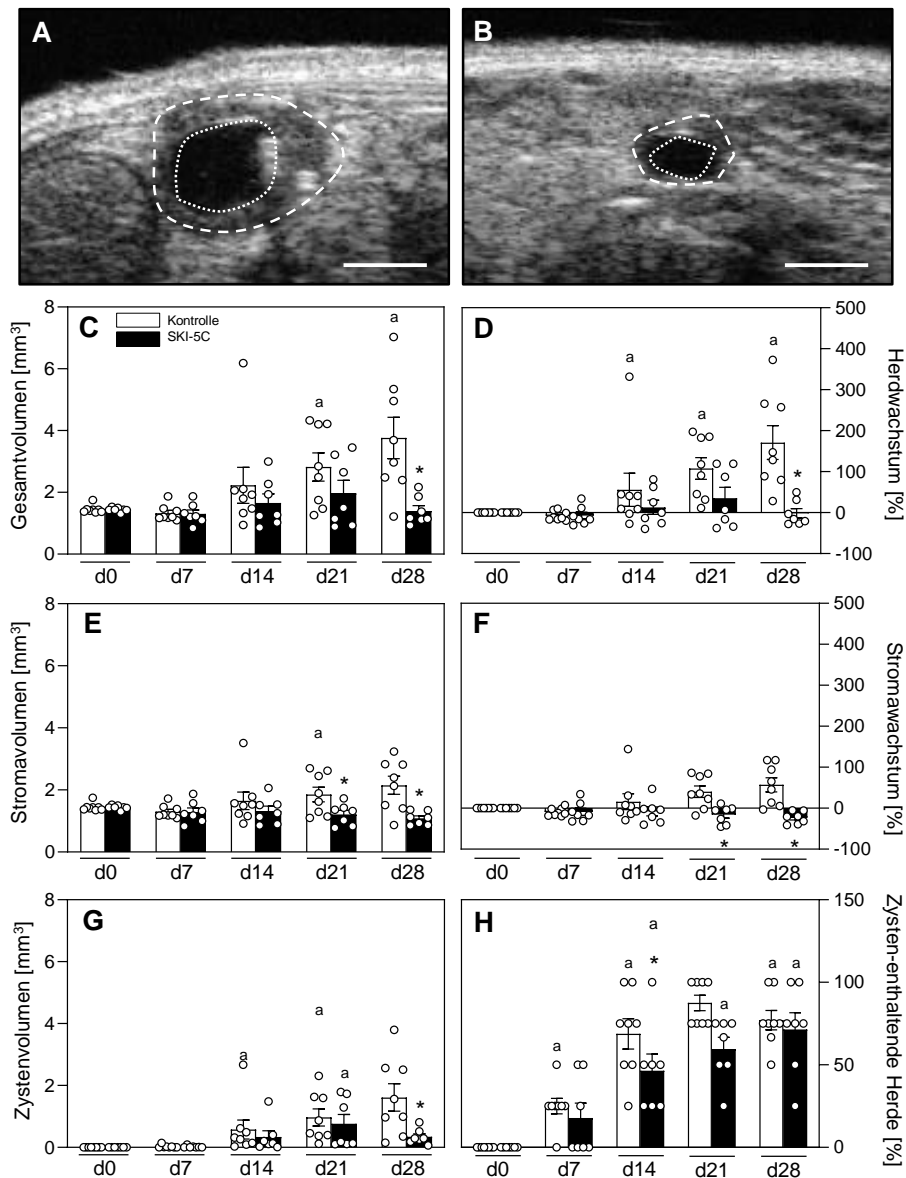


Abbildung 12: **A, B:** Hochauflösende Ultraschall-Bildgebung von Endometrioseherden an Tag 28 nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und SKI-5C-behandelten BALB/c Maus (**B**). Die Endometrioseherde sind durch die gestrichelten Linien markiert, ihre Zysten durch gepunktete 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 Anteil der Zysten-enthaltenden Herde (in %, **H**) von Endometrioseherden unmittelbar (d0) und an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 8) und SKI-5C-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 7). Mittelwert ± SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle, ^ap < 0,05 vs. d0 der jeweiligen Gruppe.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Rückenhautkammermodells ergaben auch die sonographischen Untersuchungen, dass die Behandlung mit SKI-5C das Wachstum der induzierten Herde signifikant hemmen konnte. Unmittelbar nach der Transplantation des Uterusgewebes von Spendermäusen an die Bauchwand der Empfängertiere zeigten die Transplantate in der Kontroll- und SKI-5C-behandelten Gruppe ein vergleichbares Anfangsvolumen von $\sim 1,5 \text{ mm}^3$ (Abb. 12C). Im weiteren Verlauf nahm das Volumen der sich neu entwickelnden Endometrioseherde bei den Vehikel-behandelten Mäusen kontinuierlich zu, während das Wachstum bei den SKI-5C-behandelten Tieren signifikant gehemmt wurde (Abb. 12C und D). Das im Vergleich mit der Kontrolle an den Tagen 21 und 28 verminderte Wachstum der Endometrioseherde der SKI-5C-behandelten Tiere war auf ein reduziertes Stroma- und Zystenvolumen zurückzuführen (Abb. 12E-G). Dennoch war der ermittelte Anteil der Zysten-enthaltenen Herde in beiden Gruppen an Tag 28 vergleichbar (Abb. 12H).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten zusätzliche histologische Analysen an Tag 28, dass die SKI-5C-behandelten Endometrioseherde auch kleinere zystenartig erweiterte Drüsen enthielten (Abb. 13A und B).

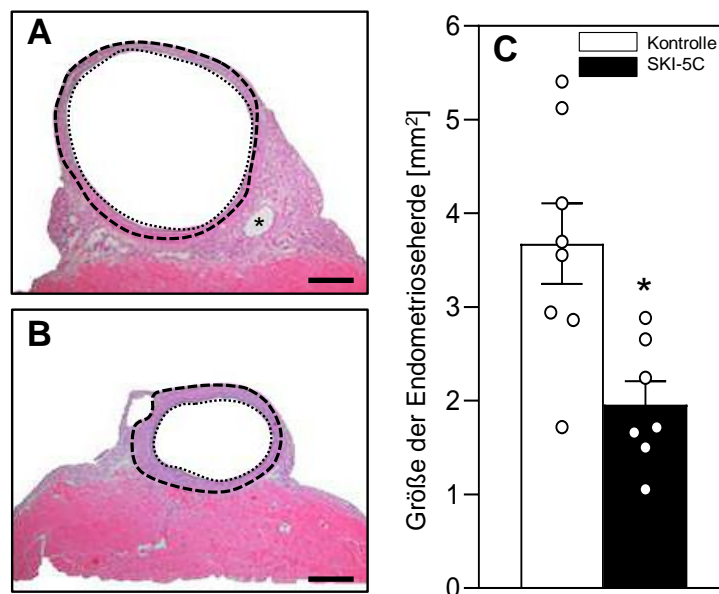


Abbildung 13: **A, B:** HE-gefärbte Gewebeschnitte von Endometrioseherden an Tag 28 nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer SKI-5C-behandelten BALB/c-Maus (**B**). Die Endometrioseherde sind durch die gestrichelten Linien markiert, ihre Zysten durch gepunktete Linien. Das Sternchen kennzeichnet die Naht (**A**). Maßstab = 500 μm . **C:** Größe (in mm^2) von Endometrioseherden an Tag 28 nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weißer Balken, $n = 8$) und SKI-5C-behandelten BALB/c-Mäusen (schwarzer Balken, $n = 7$). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Außerdem wiesen sie im Vergleich zu den Kontrollen auch eine mit einem Messschieber gemessene signifikant kleinere Herdgröße auf (Abb. 13C).

6.1.2.2 Vaskularisierung der Endometrioseherde

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss von SKI-5C auf die Angiogenese und die damit verbundene Vaskularisierung der induzierten Endometrioseherde zu untersuchen. Die Ausbildung eines neuen mikrovaskulären Netzwerks ist von entscheidender Bedeutung für die Entstehung von Endometrioseherden. Eine Reihe vorheriger Studien konnten zeigen, dass durch die Inhibition von SPHK1 die Bildung neuer Gefäßnetzwerke in verschiedenen Tumorarten gehemmt werden kann [DAI et al., 2017]. Deshalb wurde die Vaskularisierung der Endometrioseherde nach einer Beobachtungszeit von 7 und 28 Tagen immunhistochemisch untersucht (Abb. 14A-D). Zum Nachweis von Gefäßen wurde der Endothelzellmarker CD31 verwendet.

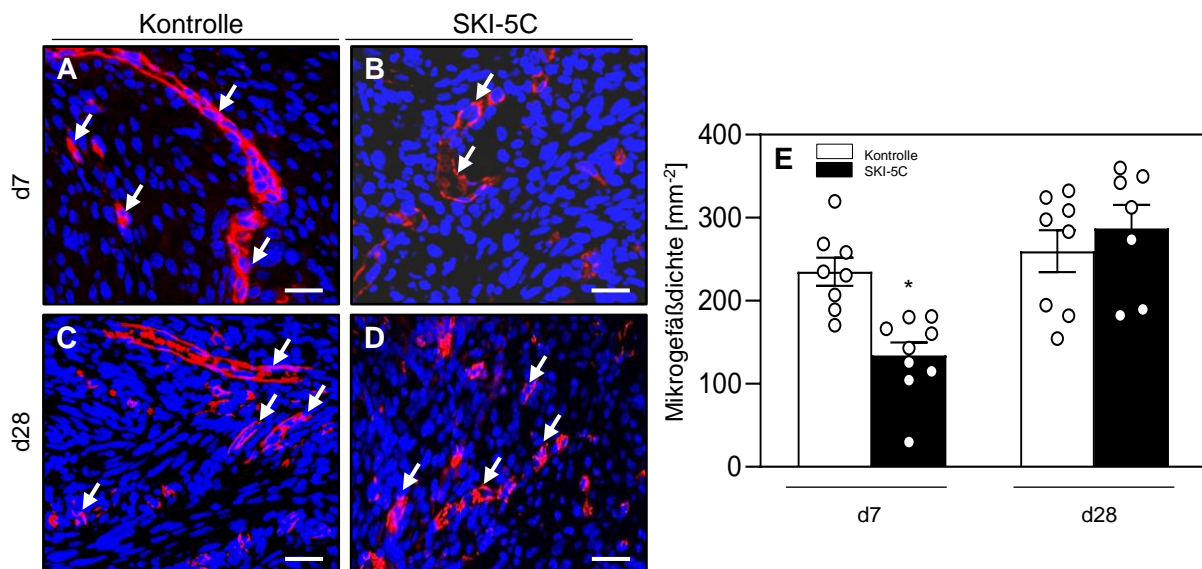


Abbildung 14: A-D: Immunhistochemischer Nachweis von CD31-positiven Mikrogefäßen (Pfeile) im Stroma von Endometrioseherden an den Tagen 7 (A, B) und 28 (C, D) nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand von Vehikel-behandelten (Kontrolle, A, C) und SKI-5C-behandelten BALB/c-Mäusen (B, D). Die Schnitte wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen CD31 wurde zum Nachweis von Endothelzellen (rot) verwendet. Maßstab = 40 µm. E: Mikrogefäßdichte (in mm²) im Stroma von Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 8-9) und SKI-5C-behandelten BALB/c-Mäusen (schwarze Balken, n = 7-9). Mittelwert ± SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle.

Die Analyse zeigte, dass die Inhibition von SPHK1 bereits in der frühen Entwicklungsphase die Vaskularisierung der sich neu bildenden Endometrioseherde hemmt. So

ergab die quantitative Analyse der CD31-positiven Mikrogefäße, dass die SKI-5C-behandelten Herde an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant niedrigere Mikrogefäßdichte aufwiesen. Nach 28 Tagen konnte allerdings kein Unterschied mehr in der Mikrogefäßdichte zwischen den Herden beider Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 14E).

6.1.2.3 Zellproliferation in den Endometrioseherden

Da die Progression einer Endometriose mit einer erhöhten Proliferationsrate des ekto-phen Endometriums verbunden ist und S1P einen Einfluss auf die Zellproliferation ausübt [HOBSON et al., 2001], wurde zusätzlich auch die Wirkung von SKI-5C auf die Proliferation der Stroma- und Drüsenzellen in den Endometrioseherden untersucht.

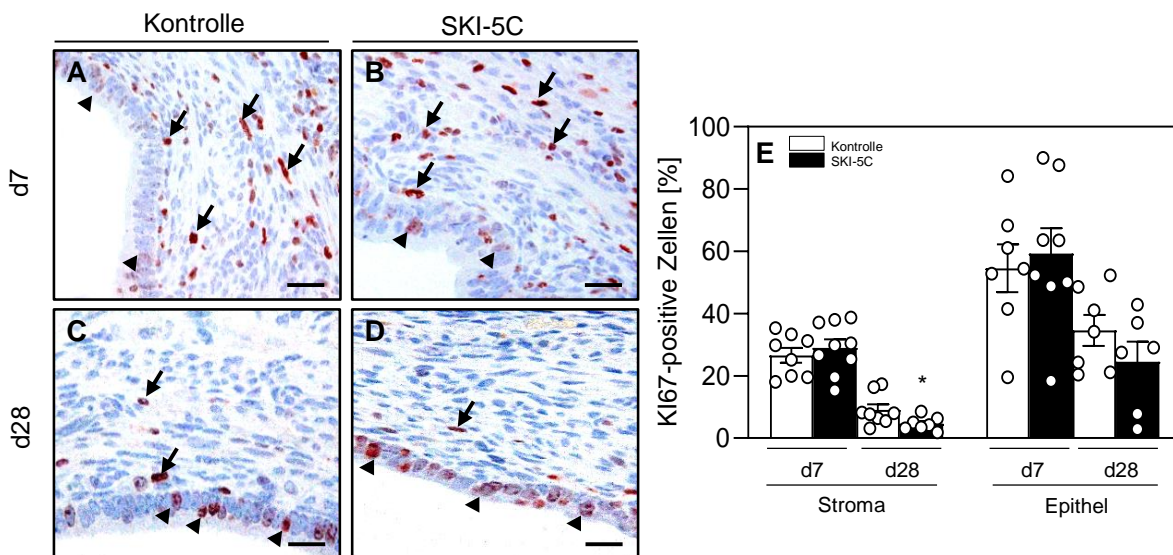


Abbildung 15: A-D: Immunohistochemischer Nachweis von proliferierenden Ki67-positiven Zellen im Stroma (Pfeile) und in den Drüsen (Pfeilspitzen) von Endometrioseherden an den Tagen 7 (A, B) und 28 (C, D) nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand von Vehikel-behandelten (Kontrolle, A, C) und SKI-5C-behandelten BALB/c-Mäusen (B, D). Maßstab = 20 μm. E: Ki67-positiv Zellen (in %) im Stroma und den Drüsen von Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 8-9) und SKI-5C-behandelten BALB/c-Mäusen (schwarze Balken, n = 7-9). Mittelwert ± SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle.

An den Tagen 7 und 28 wurde anhand der Anzahl von Ki67-positiven Zellen die Proliferationsrate bestimmt. An Tag 7 konnte in der frühen Entwicklungsphase in der Kontroll- und Behandlungsgruppe eine vergleichbare Anzahl von proliferierenden Stroma- und Drüsenzellen nachgewiesen werden (Abb. 15A, B und E). An Tag 28 zeigten die Herde beider Gruppen eine deutlich geringere Anzahl von proliferierenden Stroma- und Drüsenzellen (Abb. 15C-E). Darüber hinaus war die Proliferation von Stromazellen in den

SKI-5C-behandelten Herden zu diesem späten Zeitpunkt im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 15C-E).

6.1.3 Einfluss von SKI-5C auf die weiblichen Geschlechtsorgane

Es wird angenommen, dass S1P einen Einfluss auf die Regulierung der Uterusmotilität während der Embryoimplantation, der Schwangerschaft und der Geburt hat [LEIBER et al., 2007].

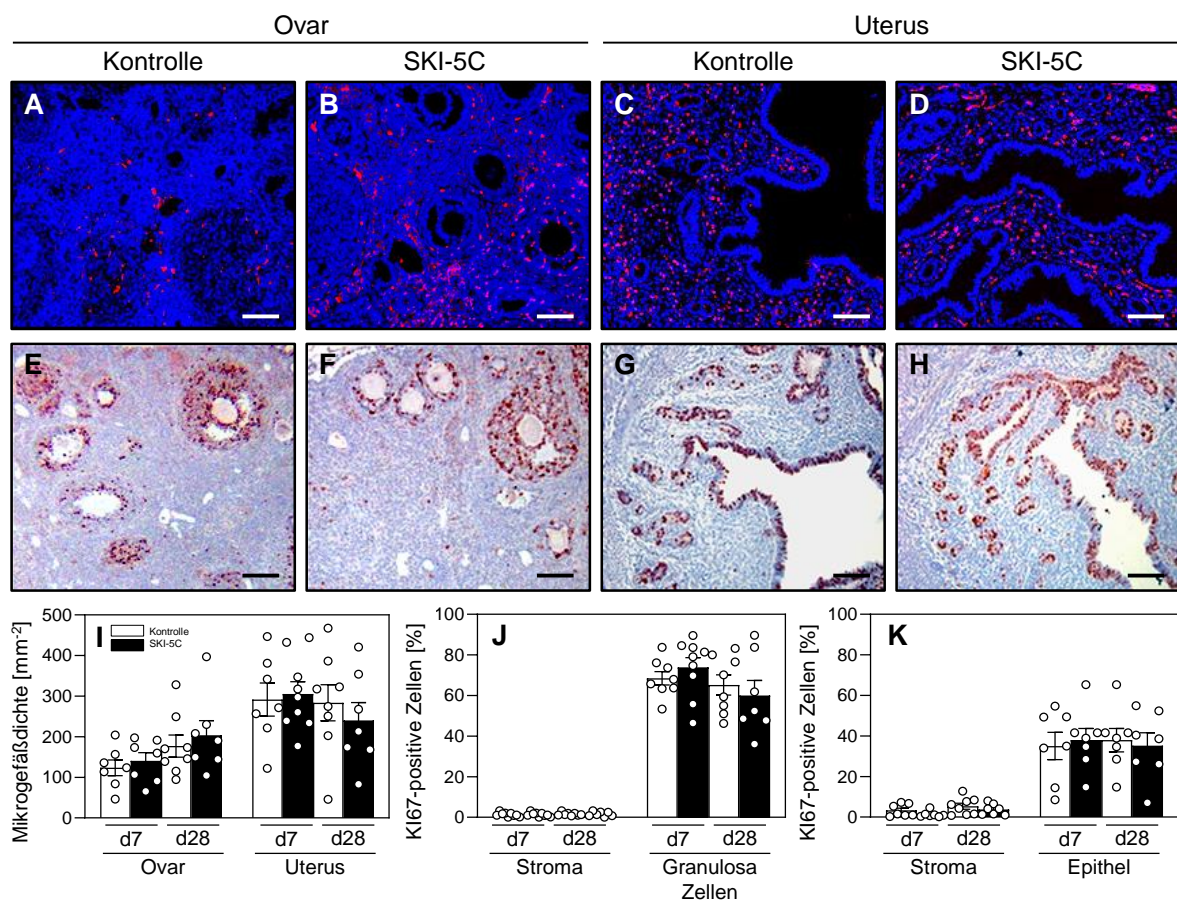


Abbildung 16: A-H: Immunhistochemischer Nachweis von CD31-positiven Mikrogefäßen (A-D) und Ki67-positiven Zellen (E-H) in Ovarien (A, B, E, F) und Uteri (C, D, G, H) an Tag 28 nach der Transplantation von Uterusgewebe an die Bauchwand von Vehikel-behandelten (Kontrolle, A, C, E, G) und SKI-5C-behandelten BALB/c Mäusen (B, D, F, H). Die Schnitte (A-D) wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen CD31 wurde zum Nachweis von Endothelzellen (rot) verwendet. Die Schnitte (E-H) wurden mit Avidin-Peroxidase und Hämalaun angefärbt, um die inaktiven Zellen (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen Ki67 wurde zum Nachweis von aktiven, proliferierenden Zellen (rot) verwendet. Maßstab = 100 µm. I: Mikrogefäßdichte (in mm²) der Ovarien und Uteri von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 8-9) und SKI-5C-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 7-9). J, K: Ki67-positiv Zellen (in %) im Stroma und in den Granulosazellen der Ovarien (J) sowie im Stroma- und im Drüsengewebe der Uteri (K) in Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 7-8) und SKI-5C-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 7-9). Mittelwert ± SEM.

Allerdings ist über die genaue Wirkung und den Einfluss von S1P auf zelluläre Prozesse innerhalb der weiblichen Geschlechtsorgane bislang nur wenig bekannt. Deshalb und um mögliche Nebenwirkungen von SKI-5C auf die Fortpflanzungsorgane zu untersuchen, wurden terminal die Ovarien und Uteri der Versuchstiere entnommen, um immunhistochemische Analysen zur Beurteilung der Vaskularisierung und Proliferation dieser Gewebe durchzuführen.

Die Ovarien und Uteri der Tiere aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe wiesen morphologisch keine Besonderheiten auf. Außerdem konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Mikrogefäßdichte und der Anzahl proliferierender Zellen zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 16A-K).

6.2 Einfluss von SEW2871 auf Endometrioseherde

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von SEW2871 auf das Wachstum und die Vaskularisierung von induzierten Endometrioseherden im Rückenhautkammermodell untersucht. Die dafür gewählte Dosierung von 10 mg/kg KG SEW2871 führte zu keinen toxischen Nebenwirkungen. Der Allgemeinzustand der behandelten Tiere und ihr Schlaf-, Putz- und Fressverhalten waren unauffällig.

6.2.1 Endometrioseherde im Rückenhautkammermodell

6.2.1.1 Wachstum und Vaskularisierung der Endometrioseherde

Unmittelbar nach der Transplantation der Endometriumfragmente (Tag 0) zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eine vergleichbare initiale Größe der Fragmente von $\sim 0,9 \text{ mm}^2$ in der Kontroll- und Behandlungsgruppe. Über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen wiesen die induzierten Endometrioseherde der SEW2871-behandelten Gruppe eine vergleichbare Größenzunahme wie die Herde in der Kontrollgruppe auf (Abb. 17A und B). An Tag 14 lag die Größe bei $\sim 1,4 \text{ mm}^2$ in den SEW2871-behandelten Tieren und bei $\sim 1,3 \text{ mm}^2$ in der Kontrollgruppe.

Ab dem 3. und bis zum 10. Versuchstag konnte eine leicht reduzierte Vaskularisierung der Endometrioseherde in der Behandlungsgruppe festgestellt werden.

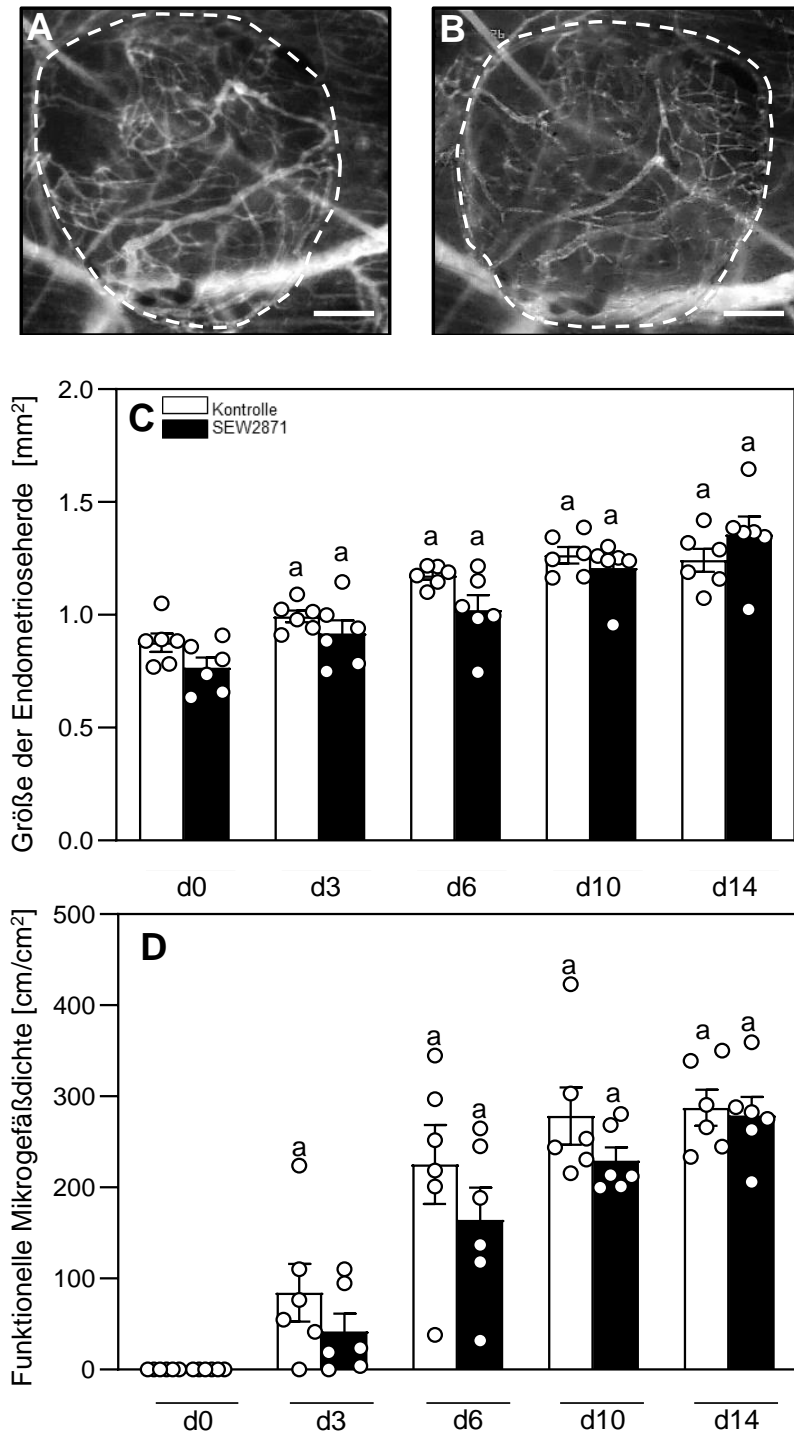


Abbildung 17: **A, B:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des Blutgefäßnetzwerks von Endometrioseherden an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer SEW2871-behandelten BALB/c Maus (**B**) nach retrobulbärer Injektion von 5% FITC-Dextran. Die Grenzen der Herde sind durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet. Maßstab = 225 μ m. **C, D:** Größe (in mm², **C**) und funktionelle Mikrogefäßdichte (in cm/cm², **D**) von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 6) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 6). Mittelwert \pm SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle, ^ap < 0,05 vs. d0 der jeweiligen Gruppe.

Dennoch war am Versuchsende die funktionelle Mikrogefäßdichte in den transplantierten Endometriumfragmenten mit 296 cm/cm² in der Kontrollgruppe und 280 cm/cm² in der SEW2871-behandelten Gruppe vergleichbar (Abb. 17A-D). Dagegen war der Durchmesser der Mikrogefäße an Tag 3 in den SEW2871-behandelten Endometrioseherden mit 23,6 µm im Vergleich zur Kontrolle mit 14,8 µm signifikant größer. Das Verhältnis näherte sich aber im weiteren Verlauf zwischen den Gruppen an. Die zentrale Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss waren in beiden Gruppen vergleichbar (Tab. 2).

Table 2: Durchmesser (in µm), zentrale Blutzellgeschwindigkeit (in µm/s) und volumetrischer Blutfluss (in pl/s) von Mikrogefäßen in Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, n = 6) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (n = 6). Mittelwert ± SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle; ^ap < 0,05 vs. d3 der jeweiligen Gruppe.

	d0	d3	d6	d10	d14
Durchmesser (µm)					
Kontrolle	-	14,8 ± 1,9	17,8 ± 2,3	12,0 ± 0,8 ^a	13,2 ± 0,7
SEW2871	-	23,6 ± 2,1*	14,3 ± 1,4	13,2 ± 1,0 ^a	12,5 ± 0,6 ^a
Zentrale Blutzellgeschwindigkeit (µm/s)					
Kontrolle	-	103,6 ± 31,0	196,8 ± 18,7 ^a	209,7 ± 10,2 ^a	225,9 ± 7,7 ^a
SEW2871	-	186,4 ± 54,4	184,6 ± 22,0	249,8 ± 23,6	136,5 ± 43,4
Volumetrischer Blutfluss (pl/s)					
Kontrolle	-	14,4 ± 2,9	24,8 ± 4,9	21,0 ± 2,8	22,4 ± 1,5
SEW2871	-	19,6 ± 6,7	23,3 ± 4,0	23,3 ± 1,4	22,8 ± 1,7

Um den Einfluss von SEW2871 auf die Angiogenese und Vaskularisierung besser beurteilen zu können, wurde auch in diesem Abschnitt der Endothelzellmarker CD31 zur Bestimmung der Mikrogefäßdichte verwendet. Nach dem Ablauf der 14-tägigen Versuchsdauer wurden die histologischen Schnitte der Endometrioseherde entsprechend immunhistochemisch gefärbt und analysiert. In Übereinstimmung mit den durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlangten Erkenntnisse ergab die quantitative Analyse der immunhistochemischen Schnitte, dass die Mikrogefäßdichte der SEW2871-behandelten Herde und der Kontrollgruppe an Tag 14 vergleichbar war (Abb. 18A-C).

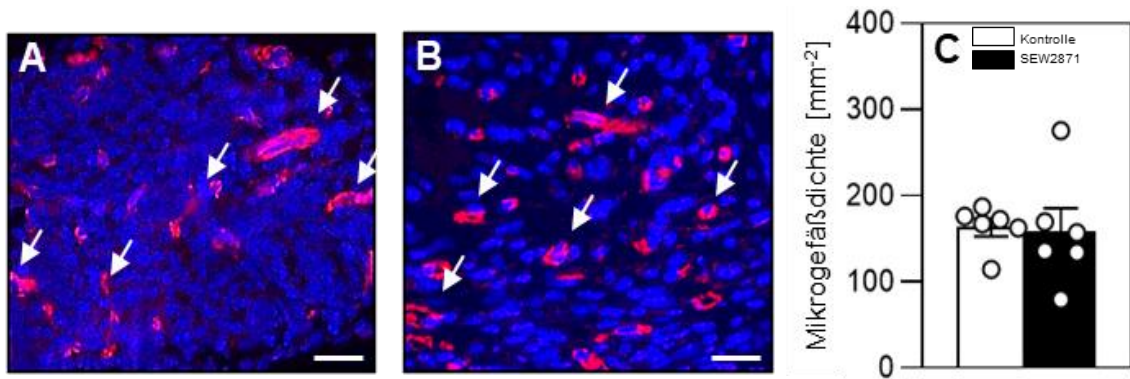


Abbildung 18: **A, B:** Immunhistochemischer Nachweis von CD31-positiven Mikrogefäßen (Pfeile) im Stroma von Endometrioseherden an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer SEW2871-behandelten BALB/c Maus (**B**). Die Schnitte wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen CD31 wurde zum Nachweis von Endothelzellen (rot) verwendet. Maßstab = 20 μm . **C:** Mikrogefäßdichte (in mm^{-2}) im Stroma von Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weißer Balken, $n = 6$) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (schwarzer Balken, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM.

Durch die quantitative Analyse von Ki67-positiven Zellen in den am Studienende entnommenen Endometrioseherden konnte die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen in der Kontroll- und Behandlungsgruppe miteinander verglichen werden. Dabei ergab sich, dass SEW2871 keinen hemmenden Einfluss auf die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen hatte, da eine vergleichbare Anzahl von Ki67-positiven Zellen in beiden Gruppen vorhanden war (Abb. 19A-C).

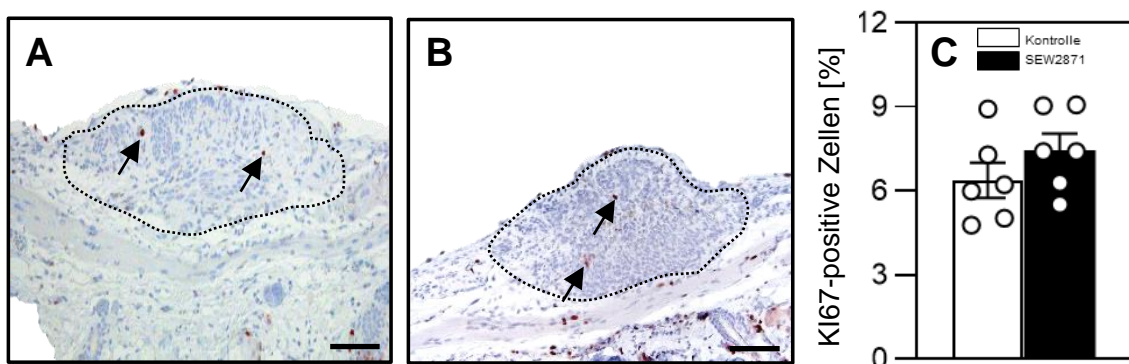


Abbildung 19: **A, B:** Immunhistochemischer Nachweis von proliferierenden Ki67-positiven Zellen (Pfeile) im Stroma von Endometrioseherden am Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer SEW2871-behandelten BALB/c Maus (**B**). Die Begrenzung der Endometrioseherde ist durch die gepunkteten Linien markiert. Maßstab = 100 μm . **C:** Ki67-positiven Zellen (in %) im Stroma von Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weißer Balken, $n = 6$) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (schwarzer Balken, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM.

Statistisch ergaben sich zwar keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen, aber zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Einsatz von SEW2871

zumindest zu Beginn der Behandlung einen leicht hemmenden Einfluss auf die Angiogenese und die damit verbundene vaskuläre Netzwerkbildung in den induzierten Endometrioseherden hatte. Diese inhibierende Wirkung konnte aber am Versuchsende nicht mehr beobachtet werden.

6.2.2 Einfluss von SEW2871 auf die weiblichen Geschlechtsorgane

Um die Wirkung von SEW2871 auf die weiblichen Geschlechtsorgane zu untersuchen, wurden am 14. Tag nach der Induktion der Endometrioseherde in der Rückenhautkammer weitere immunhistochemische Analysen zur Vaskularisierung und Zellproliferation in den Ovarien und den Uteri durchgeführt (Abb. 20A-K).

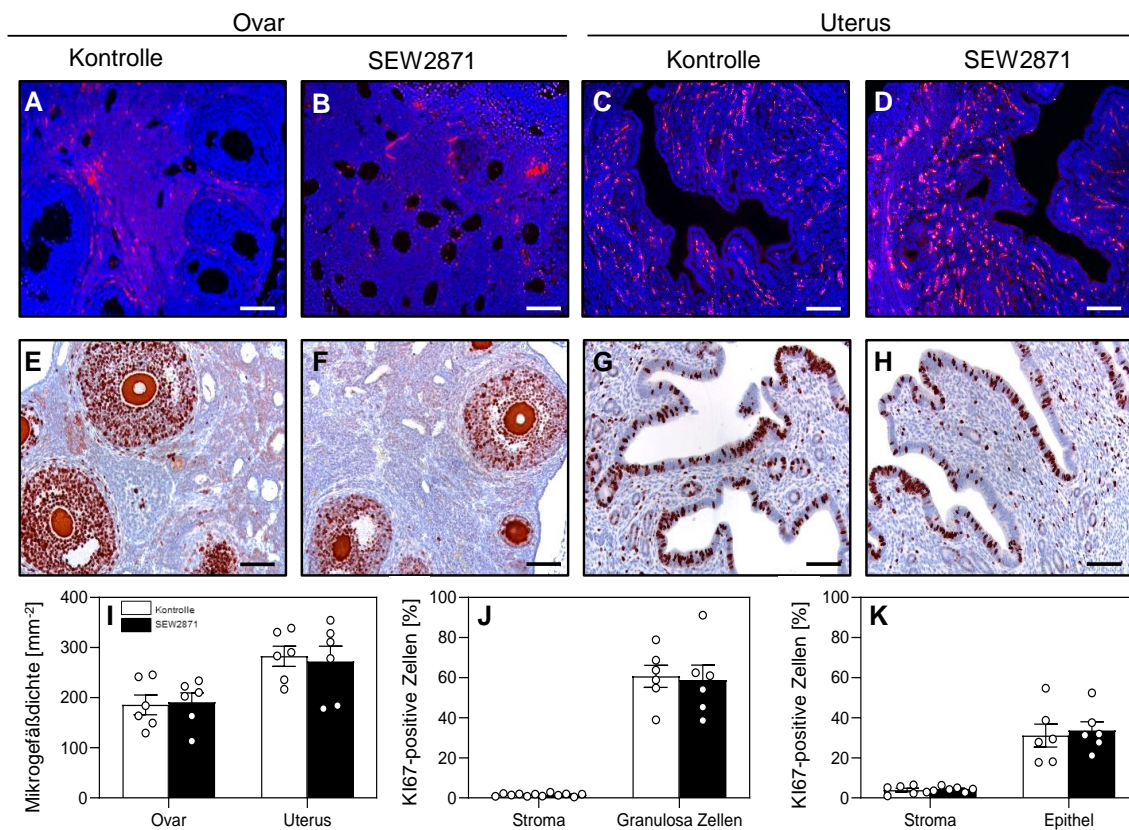


Abbildung 20: A-H: Immunhistochemischer Nachweis von CD31-positiven Mikrogefäßen (A-D) und Ki67-positiven Zellen (E-H) in Ovarien (A, B, E, F) und Uteri (C, D, G, H) an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, A, C, E, G) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (B, D, F, H). Die Schnitte (A-D) wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen CD31 wurde zum Nachweis von Endothelzellen (rot) verwendet. Die Schnitte (E-H) wurden mit Avidin-Peroxidase und Hämalaun angefärbt, um die inaktiven Zellen (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen Ki67 wurde zum Nachweis von aktiven, proliferierenden Zellen (rot) verwendet. Maßstab = 100 µm. I: Mikrogefäßdichte (in mm⁻²) der Ovarien und Uteri von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 6) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 6). J, K: Ki67-positiv Zellen (in %) im Stroma und in den Granulosazellen der Ovarien (J) sowie im Stroma- und im Drüsen-gewebe der Uteri (K) in Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 6) und SEW2871-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 6). Mittelwert ± SEM.

Die Uteri und Ovarien der Tiere aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe wiesen morphologisch keine Besonderheiten auf. Außerdem waren sowohl die Mikrogefäßdichte als auch die Anzahl proliferierender Zellen in beiden Gruppen und Geweben vergleichbar.

6.3 Einfluss von FTY720 auf Endometrioseherde

Im dritten und letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von FTY720 auf das Wachstum und die Vaskularisierung von induzierten Endometrioseherden im Rückenhautkammermodell untersucht. Die dafür gewählte Dosierung von 10 mg/kg KG FTY720 führte zu keinen toxischen Nebenwirkungen. Der Allgemeinzustand der Tiere und ihr Schlaf-, Putz- und Fressverhalten waren unauffällig.

6.3.1 Endometrioseherde im Rückenhautkammermodell

6.3.1.1 Wachstum und Vaskularisierung der Endometrioseherde

Unmittelbar nach Transplantation (Tag 0) zeigten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Endometriumfragmente eine initiale Größe von $\sim 0,9 \text{ mm}^2$. Bei der Kontrollgruppe und der FTY720-behandelten Gruppe konnte bis zum 6. Tag eine vergleichbare Größenzunahme der Herde festgestellt werden. Am 10. Tag des Versuchs zeigte sich bei der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikant geringere Herdgröße. Am letzten Untersuchungstag gab es allerdings keinen statistisch signifikanten Größenunterschied mehr zwischen den beiden Gruppen. Dennoch waren die Endometrioseherde in der Kontrollgruppe mit $\sim 1,6 \text{ mm}^2$ etwas grösser als die in der Behandlungsgruppe mit $\sim 1,4 \text{ mm}^2$ (Abb. 21A-C).

Bei der ersten mikroskopischen Aufnahme an Tag 0 enthielten die Endometriumfragmente in beiden Gruppen noch keine perfundierten Gefäße. Bei den weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass sich in den induzierten Endometrioseherden der Kontroll- und Behandlungsgruppe neue Gefäßnetzwerke ausbildeten. Die Dichte dieser Gefäßnetzwerke war in der Behandlungsgruppe leicht höher als in der Kontrollgruppe ohne statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 21D).

Die Mikrogefäße innerhalb der FTY720-behandelten Endometrioseherde wiesen über die Beobachtungszeit von 14 Tagen etwas kleinere Durchmesser im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Auch hier wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

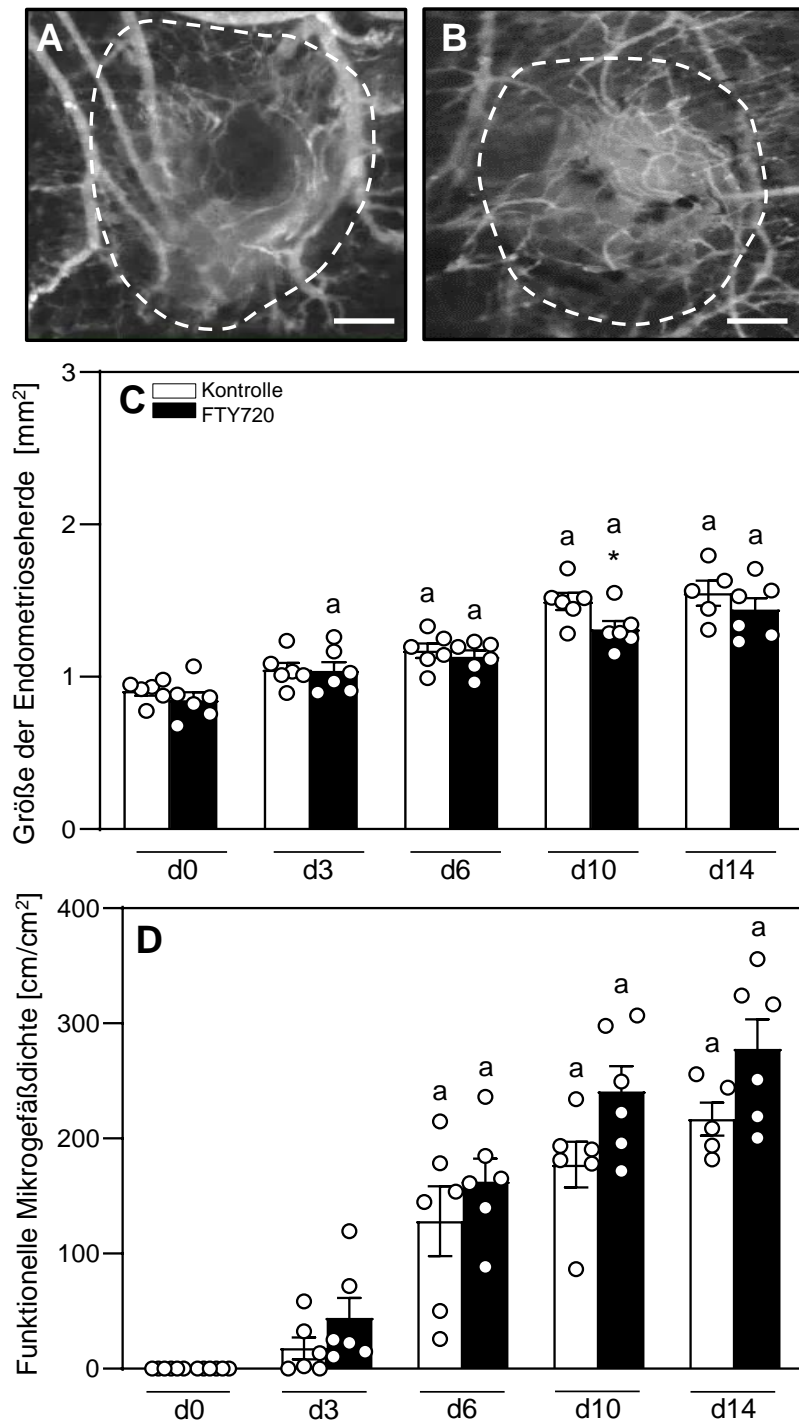


Abbildung 21: **A, B:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des Blutgefäßnetzwerks von Endometrioseherden am Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer FTY720-behandelten BALB/c Maus (**B**) nach retrobulbärer Injektion von 5% FITC-Dextran. Die Grenzen der Herde sind durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet. Maßstab = 225 μ m. **C, D:** Größe (in mm^2 , **C**) und funktionelle Mikrogefäßdichte (in cm/cm^2 , **D**) von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, $n = 6$) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, ^a $p < 0,05$ vs. d0 der jeweiligen Gruppe.

Entsprechend zeigte auch die Analyse der zentralen Blutzellgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses innerhalb dieser Mikrogefäße keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tab. 3).

Tabelle 3: Durchmesser (in μm), zentrale Blutzellgeschwindigkeit (in $\mu\text{m/s}$) und volumetrischer Blutfluss (in pl/s) in Mikrogefäßen von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, $n = 6$) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen ($n = 6$). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ^a $p < 0,05$ vs. d3 der jeweiligen Gruppe.

	d0	d3	d6	d10	d14
Durchmesser (μm)					
Kontrolle	-	28,0 \pm 4,0	20,0 \pm 2,4 ^a	15,4 \pm 1,5	15,2 \pm 1,1 ^a
FTY720	-	25,0 \pm 1,6	17,9 \pm 1,1 ^a	15,2 \pm 0,7	13,7 \pm 0,4 ^a
Zentrale Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)					
Kontrolle	-	31,1 \pm 11,1	137,3 \pm 24,3 ^a	160,2 \pm 18,6 ^a	184,0 \pm 46,7 ^a
FTY720	-	97,1 \pm 40,3	131,8 \pm 19,7 ^a	194,3 \pm 15,0 ^a	210,5 \pm 16,5 ^a
Volumetrischer Blutfluss (pl/s)					
Kontrolle	-	24,9 \pm 14,6	32,3 \pm 6,2	22,8 \pm 2,7	31,1 \pm 4,3
FTY720	-	41,6 \pm 16,4	25,7 \pm 5,6	28,2 \pm 3,8	24,3 \pm 2,1

Somit ergab sich aus den Analysen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, dass die Behandlung der Endometrioseherde mit FTY720 in der Rückenhautkammer das Wachstum der Herde innerhalb des Versuchszeitraums leicht inhibierte. Es konnte aber kein signifikant hemmender Effekt auf die Vaskularisierung festgestellt werden.

Um den Einfluss von FTY720 auf die Angiogenese und Vaskularisierung besser beurteilen zu können, wurde auch in diesem Abschnitt der Endothelzellmarker CD31 verwendet, um zusätzlich immunhistochemisch die Mikrogefäßdichte zu bestimmen. Nach Ablauf der 14-tägigen Versuchsdauer wurden die histologischen Schnitte der Endometrioseherde entsprechend gefärbt und analysiert. Die Ergebnisse stimmen mit denen aus der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie überein. Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Mikrogefäßdichte beider Gruppen (Abb. 22A-C).

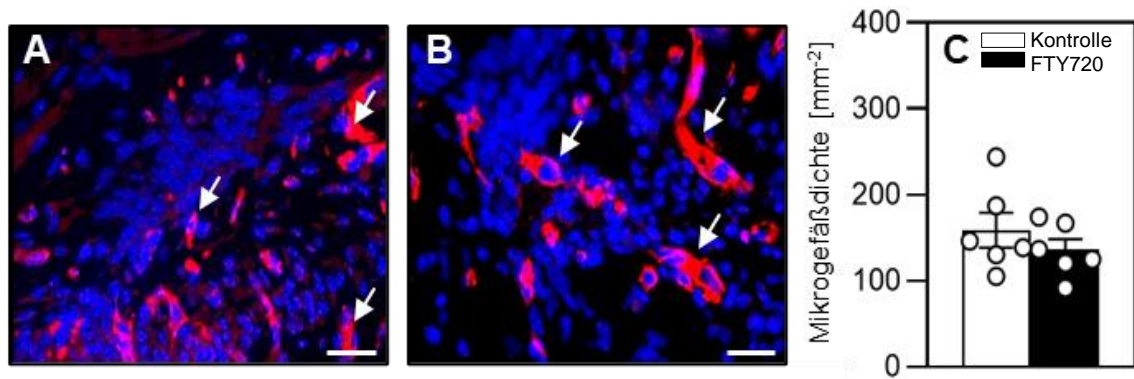


Abbildung 22: **A, B:** Immunhistochemischer Nachweis von CD31-positiven Mikrogefäßen (Pfeile) im Stroma von Endometrioseherden an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer FTY720-behandelten BALB/c Maus (**B**). Die Schnitte wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen CD31 wurde zum Nachweis von Endothelzellen (rot) verwendet. Maßstab = 20 μm . **C:** Mikrogefäßdichte (in mm^2) im Stroma von Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weißer Balken, $n = 6$) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen (schwarzer Balken, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM.

Durch die Quantifizierung Ki67-positiver Zellen in den am Studienende entnommenen Endometrioseherden konnte die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen in der Kontroll- und Behandlungsgruppe miteinander verglichen werden. Dabei wurde eine vergleichbare Anzahl von proliferierenden Stroma- und Drüsenzellen in beiden Gruppen gefunden (Abb. 23A-C).

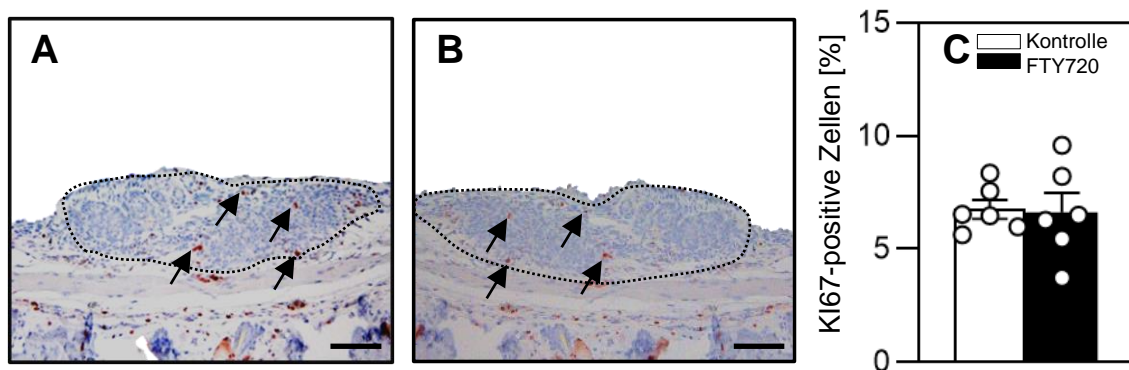


Abbildung 23: **A, B:** Immunhistochemischer Nachweis von proliferierenden Ki67-positiven Zellen (Pfeile) im Stroma von Endometrioseherden an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (Kontrolle, **A**) und einer FTY720-behandelten BALB/c Maus (**B**). Die Begrenzung der Endometrioseherde ist durch die gepunkteten Linien markiert. Maßstab = 100 μm . **C:** Ki67-positive Zellen (in %) im Stroma von Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weißer Balken, $n = 6$) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen (schwarzer Balken, $n = 6$). Mittelwert \pm SEM.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die Behandlung mit FTY720 nur einen geringen Einfluss auf die Vaskularisierung und das Wachstum von induzierten Endometrioseherden in der Rückenhautkammer hat.

6.3.2 Der Einfluss von FTY720 auf die weiblichen Geschlechtsorgane

Um den Einfluss von FTY720 auf die weiblichen Geschlechtsorgane zu untersuchen, wurden am 14. Tag nach der Induktion der Endometrioseherde in der Rückenhautkammer weitere immunhistochemische Analysen zur Vaskularisierung und Zellproliferation durchgeführt. Die Uteri und Ovarien der Tiere aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe wiesen morphologisch keine Besonderheiten auf. Außerdem war sowohl die Mikrogefäßdichte als auch die Anzahl proliferierender Zellen in beiden Gruppen und Geweben vergleichbar (Abb. 24A-K).

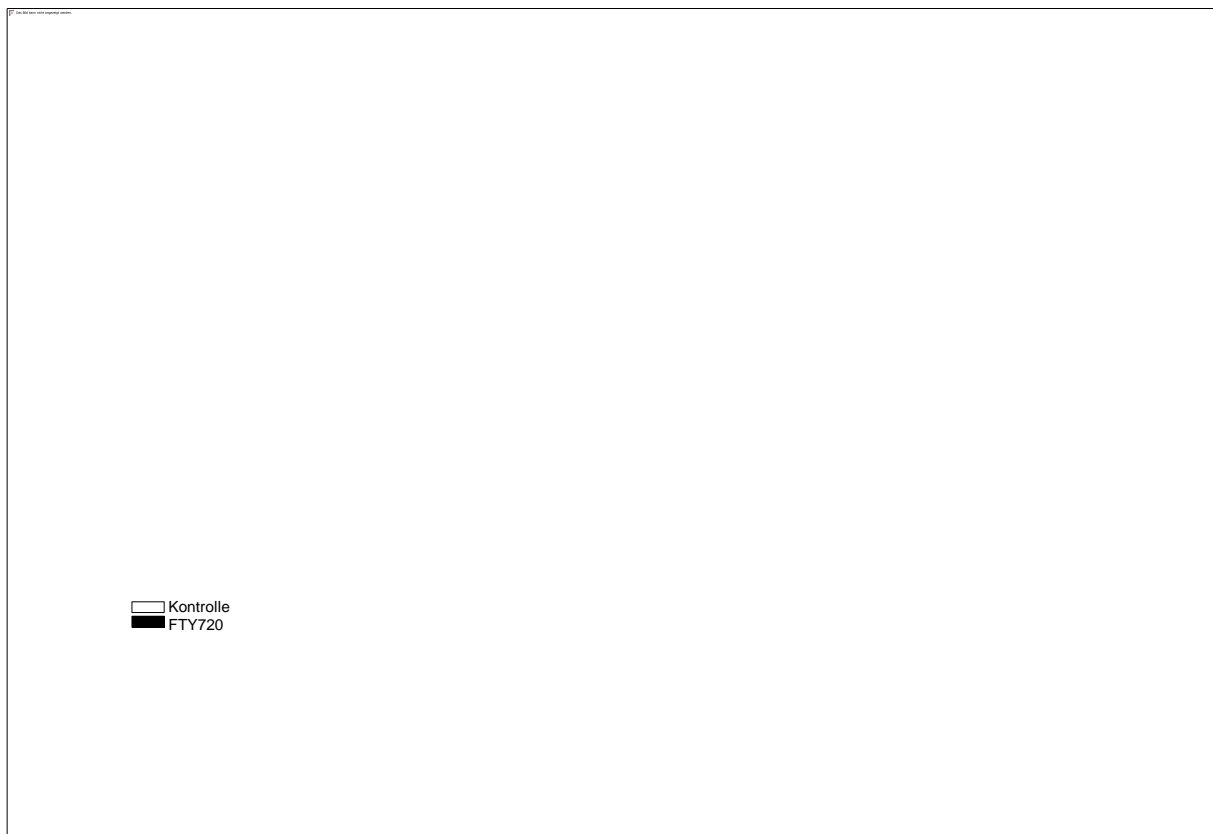


Abbildung 24: A-H: Immunhistochemischer Nachweis von CD31-positiven Mikrogefäßen (A-D) und Ki67-positiven Zellen (E-H) in Ovarien (A, B, E, F) und Uteri (C, D, G, H) an Tag 14 nach der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer von Vehikel-behandelten (Kontrolle, A, C, E, G) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen (B, D, F, H). Die Schnitte (A-D) wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, um die Zellkerne (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen CD31 wurde zum Nachweis von Endothelzellen (rot) verwendet. Die Schnitte (E-H) wurden mit Avidin-Peroxidase und Hämalaun angefärbt, um die inaktiven Zellen (blau) identifizieren zu können. Ein Antikörper gegen Ki67 wurde zum Nachweis von aktiven, proliferierenden Zellen (rot) verwendet. Maßstab = 100 μ m. I: Mikrogefäßdichte (in mm²) der Ovarien und Uteri von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 6) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 6). J, K: Ki67-positiv Zellen (in %) im Stroma und in den Granulosazellen der Ovarien (J) sowie im Stroma- und im Drüsenewebe der Uteri (K) in Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Balken, n = 6) und FTY720-behandelten BALB/c Mäusen (schwarze Balken, n = 6). Mittelwert \pm SEM.

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Einfluss von SKI-5C, SEW2871 und FTY720 auf die Entwicklung von experimentell induzierten Endometrioseherden im Mausmodell können wie folgt zusammengefasst werden:

1. SKI-5C hat eine anti-angiogene Wirkung auf induzierte murine Endometrioseherde. Während bei der Kontrollgruppe im Rückenhautkammermodell eine Zunahme der funktionellen Mikrogefäßdichte bis zum Tag 14 nachgewiesen werden konnte, zeigten die Endometrioseherde der Behandlungsgruppe eine signifikant geringere Dichte. Darüber hinaus wiesen die Mikrogefäße der SKI-5C-behandelten Herde im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlich kleineren Durchmesser auf. Im intraperitonealen Endometriosemodell konnte dies bestätigt werden. Die Inhibition von SPHK1 führte bereits in der frühen Entwicklungsphase der sich neu bildenden Endometrioseherde zur Hemmung der Vaskularisierung.

Für SEW2871 lässt sich zusammenfassend feststellen, dass der Wirkstoff zu Beginn der Behandlung einen leicht hemmenden Einfluss auf die Angiogenese und die damit verbundene vaskuläre Netzwerkbildung in den induzierten Endometrioseherden hatte. Diese inhibierende Wirkung konnte aber am Versuchsende nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Behandlung mit FTY720 hatte nur einen geringen Einfluss auf die Vaskularisierung. Ein signifikant hemmender Effekt konnte bei der Mikrogefäßdichte nicht festgestellt werden.

2. SKI-5C hemmte signifikant das Wachstum der Endometrioseherde in der Rückenhautkammer. Die Herde der Kontrollgruppe waren terminal deutlich größer als die der SKI-5C-behandelten Gruppe. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen ergaben auch die sonographischen Untersuchungen des intraperitonealen Endometriosemodells, dass das Volumen der Herde der Vehikel-behandelten Mäuse kontinuierlich zunahm, während das Wachstum der SKI-5C-behandelten Tiere signifikant gehemmt wurde. Die Proliferation von Stromazellen in den SKI-5C-behandelten Herden war im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrolle signifikant reduziert.

Die im Rückenhautkammermodell induzierten Endometrioseherde der SEW2871-behandelten Gruppe wiesen eine vergleichbare Größenzunahme auf wie die Herde

in der Kontrollgruppe. Es zeigte sich, dass SEW2871 keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum und die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen hatte.

Zusammenfassend konnte für FTY720 gezeigt werden, dass obwohl sich am 10. Tag des Versuchs bei der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikant geringere Herdgröße zeigte, FTY720 nur einen geringen Einfluss auf das Wachstum von induzierten Endometrioseherden in der Rückenhautkammer hat. Die immunhistochemische Analyse ergab eine vergleichbare Anzahl an proliferierenden Stroma- und Drüsenzellen beider Gruppen.

3. Nach Applikation von SKI-5C, SEW2871 bzw. FTY720 war festzustellen, dass die Ovarien und Uteri der Tiere aus der jeweiligen Behandlungsgruppe morphologisch keine Besonderheiten gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen. Außerdem konnten die Analysen der Mikrogefäßdichte und der Anzahl proliferierender Zellen keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Dies weist darauf hin, dass durch die durchgeführten Behandlungen mit den drei Inhibitoren keine Nebenwirkungen in den weiblichen Geschlechtsorganen verursacht wurden.

7 DISKUSSION

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Endometriosemodelle im Versuchstier

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung von SKI-5C, SEW2871 und FTY720 auf das Wachstum und die Vaskularisierung von Endometrioseherden im tierexperimentellen Modell untersucht. Bei der Endometriose handelt es sich um eine Erkrankung, die auf einer retrograden Menstruation von Endometriumgewebe in die Bauchhöhle beruht, wie sie nur beim Menschen und bei Primaten vorkommt. Allerdings sind Experimente an Primaten ethisch bedenklich und das spontane Auftreten einer Endometriose ist bei ihnen eher selten. Deshalb wird für die Erforschung dieser Erkrankung in der Regel auf andere Modelle zurückgegriffen. Zur Beurteilung der Angiogenese zählt das Modell der Chorionallantoismembran (CAM) des befruchteten Hühnereis [NAP et al., 2003] und das Modell der Rückenhautkammer, das bereits in Ratten [PAPENFUSS et al., 1979], Hamstern [ENDRICH et al., 1980] und Mäusen [CARDON et al., 1970] für andere Fragestellungen etabliert wurde. Prinzipiell ermöglichen diese Modelle eine repetitive und nicht-invasive Analyse der Angiogenese. Außerdem können im Modell der Rückenhautkammer mikrohämodynamische Parameter, wie Gefäßdurchmesser und zentrale Blutzellgeschwindigkeit, quantitativ gemessen werden [ENDRICH et al., 1980].

Experimentell wird die Ausbildung von Endometrioseherden durch die Transplantation von Endometrium an ektope Stellen induziert [GRÜMMER, 2006]. Die Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer wurde erstmals von LASCHKE et al. [2005] in Hamstern durchgeführt. Dabei ist zu bedenken, dass diese Transplantationsstelle nicht die physiologischen Umgebungsbedingungen von Endometrioseherden im Bauchraum widerspiegelt. So ist beispielsweise davon auszugehen, dass innerhalb der Rückenhautkammer andere Konzentrationen von pro- und anti-angiogenen Wachstumsfaktoren wie in der Peritonealflüssigkeit vorliegen. Außerdem werden in der Rückenhautkammer nicht die immunologischen Interaktionen zwischen dem transplantierten Endometrium und dem Peritoneum berücksichtigt. Dar-

über hinaus ist sowohl beim CAM- als auch beim Rückenhautkammer-Modell die Untersuchung der Endometrioseherde auf einen kurzen Zeitraum limitiert. Repetitive Analysen können nur über 10 bzw. 14 Tage durchgeführt werden.

Hierzu ist das Modell der intraperitonealen Endometriose besser geeignet. Allerdings hat auch dieses Modell Nachteile. So muss z.B. zur Induktion von Endometrioseherden chirurgisch die Bauchhöhle eröffnet werden, was zu Entzündungen führen und Einfluss auf die Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit und damit auch auf die Entwicklung der Endometrioseherde nehmen kann [ALLHORN et al., 2008].

Sowohl beim Modell der Rückenhautkammer als auch beim intraperitonealen Endometriosemodell sollte bedacht werden, dass gesundes nicht menstruiertes Endometriumgewebe Spendermäusen entnommen und in Empfängertiere transplantiert wird. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht vollständig auf Patientinnen mit Endometriose übertragen lassen, weil bekannt ist, dass deren Endometrium im Uterus bereits pathologische Veränderungen aufweist [MIZUGISHI et al., 2005] bzw. Endometriose durch retrograde Menstruation verursacht wird [SAMPSON, 1927a]. Um diesen Punkt zu berücksichtigen wurden kürzlich neue Ansätze entwickelt, um bei Mäusen eine Dezidualisierung des Endometriums zu induzieren [PETERSE et al., 2018]. Dabei konnten GREAVES et al. [2017] zeigen, dass Endometrioseherde, die aus dezidualisiertem Maus-Endometrium stammen, Übereinstimmungen mit humanen Endometriosherden aufweisen, so z.B. bei der Expression von Östrogenrezeptoren, der Makrophagen-Infiltration und der Schmerzinduktion.

Bei den vorhandenen Modellen kann man zwischen heterologen und homologen Mausmodellen unterscheiden. Bei den heterologen Mausmodellen wird Endometrium menschlichen Ursprungs in immuninkompetente Mäuse transplantiert. Bei den homologen Modellen erhält die Empfängermaus die Gewebefragmente einer syngenen Spendermaus [GRÜMMER et al., 2001]. Sowohl beim homologen als auch beim heterologen Ansatz besteht die Gefahr, dass sich der aktuelle Hormonstatus des Empfängers und Spenders unterscheiden, was ggf. die Entwicklung neuer Endometrioseherde beeinflussen könnte. Beim heterologen Modell führt die Verwendung von immuninkompetenten Tieren zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen dazu, dass keine normale Interaktion zwischen den Endometrioseherden und dem Immunsystem erfolgt, sodass diese immunologischen Mechanismen auch nicht analysiert und berücksichtigt werden können [HULL et al., 2005].

Beim intraperitonealen Endometriosemodell muss weiterhin bedacht werden, dass hierbei Uterusstanzen an die laterale Bauchwand angenäht werden, wobei die Verwendung des Fadenmaterials zu einer Fremdkörperreaktion führt. Eine solche Fremdkörperreaktion kann wiederum das Wachstum induzierter Endometrioseherde beeinflussen. Eine Alternative, die keine Fremdkörperreaktion auslösen würde, wäre die Verwendung einer physiologischen Lösung, in der die Endometriumfragmente in Suspension gebracht werden, um dann intraperitoneal appliziert zu werden [SOMIGLIANA et al., 1999]. Bei dieser Methode besteht allerdings die Gefahr, dass die Gewebstücke nicht anwachsen oder an Stellen anwachsen, an denen sie bei der sonographischen Analyse nicht wiedergefunden werden können.

Somit weisen alle bislang etablierten Endometriosemodelle sowohl Vor- als auch Nachteile auf. Dennoch ist die Verwendung von Mausmodellen in der Endometrioseforschung unabdingbar. Mit ihnen können standardisierte Untersuchungen zu diesem komplexen Krankheitsbild, einschließlich molekularer Analytik aufgrund der Verfügbarkeit von Antikörpern und gentechnologisch manipulierter Tiere, durchgeführt werden. Zusätzlich sind die Anschaffungs- und Haltungskosten für die dafür erforderlichen Tiere verhältnismäßig gering [GRÜMMER, 2006].

Für die Untersuchung der anti-angiogenen und anti-proliferativen Effekte von SKI-5C, SEW2871 und FTY720 auf induzierte Endometriose wurde in der vorliegenden Arbeit das Rückenhautkammermodell verwendet. Die Substanz SKI-5C wurde darüber hinaus auch im homologen intraperitonealen Modell getestet.

7.1.2 Untersuchungstechniken

7.1.2.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Angiogenese und Vaskularisierung von induzierten Endometrioseherden wurde in der vorliegenden Arbeit im Rückenhautkammermodell mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Diese Untersuchungstechnik bietet eine ideale Möglichkeit zur Darstellung und Analyse mikrovaskulärer Netzwerke in einem 14-tägigen Beobachtungszeitraum [MENGER et al., 1999]. Andere Untersuchungstechniken, wie die Xenon-Clearance Technik [HENDEL et al., 1983] oder die Mikrosphärentechnik [ZWISSELER et al., 1991], liefern nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation und waren deshalb für die vorliegende Arbeit nicht geeignet.

Die Darstellung des Blutflusses in den neu entstandenen Blutgefäßen der Endometrioseherde erfolgte durch die Anfärbung des Blutplasmas mit 5% FITC-Dextran. In der vorliegenden Arbeit wurde hochmolekulares Dextran verwendet, um sicherzustellen, dass dieses nicht aus den Blutgefäßen extravasieren kann. Um das Dextran sichtbar zu machen, wurde es an den fluoreszierenden Farbstoff FITC gekoppelt. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen bei der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie besteht das Risiko der Bildung von freien Sauerstoffradikalen, wodurch es zu phototoxischen Effekten auf das untersuchte Gewebe kommen kann [PENNING und DUBBELMAN, 1994]. Hierzu zählen neben einer Reduktion der funktionellen Kapillardichte auch eine Schädigung des Gefäßendothels und eine Steigerung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [GAWLOWSKI et al., 1989; FRIESENECKER et al., 1994]. Darüber hinaus besteht auch die unmittelbare Gefahr einer Überhitzung durch eine zu lange Belichtungsdauer und eine zu hohe Intensität der verwendeten Lichtquelle bei der mikroskopischen Aufnahme [POVLISHOCK et al., 1983]. Um dies zu verhindern, wurde in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungszeit auf maximal 20-30 Minuten pro Tier limitiert und eine niedrige Dosierung des hochmolekularen Farbstoffs 5% FITC-Dextran verwendet.

7.1.2.2 Hochauflösende Ultraschall-Bildgebung

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung des Wachstums der Endometrioseherde im intraperitonealen Modell die hochauflösende Ultraschall-Bildgebung verwendet. Dafür wurde ein 40 MHz-Ultraschallkopf mit einer Auflösung von 30 µm und einer Fokustiefe von 6 mm eingesetzt. Diese Technik ermöglichte die wiederholte und nicht-invasive Bildgebung der Herde [LASCHKE et al., 2010]. Die repetitive Ultraschall-Bildgebung stellte eine geringe Belastung für die Mäuse dar, da hierfür statt einer belastenden Injektionsnarkose eine vergleichsweise schonende Isofluran-Narkose gewählt wurde. Weiterhin waren die Untersuchungen nicht invasiv. Weil mit der Ultraschall-Bildgebung die Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten an identischen Tieren durchgeführt werden, konnte auch eine große Zahl an Tieren eingespart werden. Dies sind wichtige Kriterien zur Umsetzung des 3R-Prinzips (Replacement, Reduction and Refinement) in der tierexperimentellen Forschung [RUSSELL und BURCH, 1959].

Die geringe Intra- und Interobserver-Variabilität der Volumenmessungen individueller Endometrioseherde spricht für die Qualität dieser Untersuchungstechnik [LASCHKE et

al., 2010]. So können mittels Ultraschall ohne Kontrastmittel die stromalen und zystenartigen Anteile von Endometrioseherden qualitativ hochwertig visualisiert und unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit konnte so gezeigt werden, dass das Wachstum der Endometrioseherde zu Beginn durch eine gesteigerte Proliferation des Stromas verursacht wird und sich erst im späteren Verlauf großvolumige, zystisch-dilatierete Drüsen ausbilden, die zu einer Größenzunahme der Herde führen.

Neben der Ultraschall-Bildgebung gibt es noch andere Methoden zur Größenbestimmung von Endometrioseherden. Dazu gehört die Vermessung mit einer Schieblehre und einer anschließenden Größenberechnung mit der folgenden Formel [BECKER et al., 2008]:

$$\text{Größter Durchmesser (d1)} \times \text{kleinster Durchmesser (d2)} \times \pi/4$$

Ein Nachteil dieser Methode ergibt sich dadurch, dass die Formvariabilität von Endometrioseherden durch diese zweidimensionale Messung nur unzureichend berücksichtigt wird. Eine weitere Möglichkeit ist die Untersuchung von Endometrioseherden mittels Biolumineszenz [BECKER et al., 2008]. Hierfür werden transgene Luziferase-exprimierende Tiere als Spendertiere von Uterusfragmenten verwendet, die in Wildtyp-Mäuse implantiert werden. Nach der Injektion von Luziferin geht von den Transplantaten ein Lichtsignal aus, das in der Intensität mit der Größe der Transplantate korreliert. Eine andere Methode zur Analyse von Endometrioseherden ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Diese Untersuchungstechnik ist ein qualitativ hochwertiges Verfahren, mit dem Bilder mit gutem Weichteilkontrast und räumlicher Auflösung erzeugt werden können [BROCKMANN et al., 2007]. Neben den langen Untersuchungszeiten ist die Verfügbarkeit dieser Geräte aufgrund der hohen Kosten jedoch ein limitierender Faktor. Daher war die hochauflösende Ultraschalluntersuchung eine ideale Methode zur Analyse der Endometrioseherde. In anderen Studien konnte auch gezeigt werden, dass die Ergebnisse aus Ultraschalluntersuchungen mit histomorphometrischen Auswertungen von Gewebeschnitten sehr gut korrelieren [JOUANNOT et al., 2006].

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Einfluss der SPHK auf die Endometriose

Eine zunehmende Anzahl von Studien zeigt, dass Sphingolipide wie S1P an der Pathogenese der Endometriose beteiligt sind. Tatsächlich fördert S1P das Wachstum von endometriotischen Zellen durch die Überexpression von IL-6, einem pro-inflammatorischen Zytokin [BERGQVIST et al., 2001]. Darüber hinaus wird die Expression der S1P-Phosphatase 2 und S1P-Lyase 1 in endometriotischen Zellen dereguliert [SANTULLI et al., 2012]. Diese Enzyme regulieren die S1P-Spiegel in der Zelle.

S1P wirkt wiederum über den Rezeptor S1PR1 als Chemo-Attractant für Endothelzellen und stimuliert dadurch deren Proliferation und Migration [HLA et al., 2001]. Außerdem hält die Aktivierung von S1PR1 durch S1P die Gefäßstabilität und Barrierefunktion während der Blutgefäßentwicklung aufrecht [HISANO und HLA, 2019].

Im Unterschied dazu führen die Hemmung von SPHK1 und der damit verbundene erniedrigte endogene S1P-Spiegel zu einem endothelialen Hypersprouting [GAENGEL et al., 2012]. Weil dies mit einer unzureichenden Rekrutierung von Perizyten verbunden ist, kommt es zu einer Fehlbildung des Mikrogefäßsystems. Entsprechend weisen mehrere Studien darauf hin, dass die pharmakologische Hemmung von SPHK1 die Entwicklung funktioneller mikrovaskulärer Netzwerke unter verschiedenen pathologischen Bedingungen unterdrücken kann [DAI et al., 2017].

Da die Angiogenese eine Hauptvoraussetzung für die Entwicklung und Progression einer Endometriose in der Bauchhöhle ist, werden anti-angiogene Ansätze als erfolgsversprechende Behandlungsstrategie für die zukünftige Therapie dieser Erkrankung angesehen [LASCHKE und MENGER, 2018].

7.2.2 SKI-5C

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Blockade von SPHK1 durch den niedermolekularen Inhibitor SKI-5C die Vaskularisierung und das Wachstum von sich neu entwickelnden Endometrioseherden hemmt. Um bereits die frühe Vaskularisierung der Herde zu analysieren, wurde das Modell der Rückenhautkammer verwendet. Dabei wuchsen transplantierte Endometriumfragmente in Vehikelbehandelten Kontrollmäusen progressiv, während die Transplantate in SKI-5C-behandelten Tieren im Verlauf des Experiments sogar an Größe abnahmen. Darüber hinaus

war die funktionelle Mikrogefäßdichte von SKI-5C-behandelten Herden zwischen den Tagen 6 bis 14 im Vergleich zur Kontrolle signifikant geringer.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe die Wirkung von SKI-5C im intraperitonealen Endometriosemodell getestet [RUDZITIS-AUTH et al., 2020]. Bei diesem Modell werden Endometrioseherde chirurgisch induziert, indem Uterusstanzen von Spendermäusen an die Bauchdecke von syngenem Empfängertieren transplantiert werden, wodurch die Herde leicht für Analysen mit hochauflösender Ultraschall-Bildgebung zugänglich sind. Diese Analysen konnten zeigen, dass die Herde in Vehikel-behandelten Kontrollmäusen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 28 Tagen kontinuierlich an Größe zunahmten, während das Herdwachstum in SKI-5C-behandelten Tieren signifikant gehemmt war. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Hemmung der S1P-Signalübertragung durch die Rezeptoren S1PR1 und S1PR3 die Proliferation der Stromazellen des Endometriums unterdrückt [YOSHINO et al., 2019]. Studien an verschiedenen Tumorzellen sowie an Epithelzellen des Brustdrüsengewebes konnten nachweisen, dass dieser Effekt durch eine verringerte Expression von NF- κ B verursacht werden kann [LI et al., 2014; 2016]. In Endometrioseherden steigert die Aktivierung von NF- κ B die Zellproliferation und das Überleben [GONZÁLEZ-RAMOS et al., 2010]. Umgekehrt wurde gezeigt, dass die Hemmung von NF- κ B in endometriotischen Stromazellen die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese unterdrückt und Apoptose und Zellzyklusstillstand induziert. Dadurch wird die Phosphorylierung des κ B-Proteins gehemmt, was zur Regression von Endometrioseherden führt [GONZÁLEZ-RAMOS et al., 2008].

Darüber hinaus legen neuere Studien nahe, dass S1P die messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression von COX-2 stimuliert und damit auch die Sekretion von Prostaglandin E2 (PGE2) erhöht [RUMZHUM et al., 2016]. Ein SPHK1-Mangel ist wiederum mit einer verringerten COX-2-Expression verbunden [FURUYA et al., 2017]. Dadurch wird der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz der Hemmung des Sphingosin-Signalweges gestützt, da bereits nachwiesen wurde, dass die COX-2/PGE2-Signalübertragung die sekretorische Aktivität von Endometriumdrüsen reguliert [RUDZITIS-AUTH et al., 2018]. Untersuchungen konnten zeigen, dass SPHK1 in Drüsenepithelzellen vorkommt und die Konzentration von S1P in der Zystenflüssigkeit von Endometrioseherden erhöht ist [YOSHINO et al., 2019]. In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen konnten in der vorliegenden Arbeit in Endometrioseherden von SKI-

5C-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringere Zysten-volumina gemessen werden.

Die Ausbildung neuer vaskulärer Netzwerke wird durch eine S1P-induzierte Aktivierung von S1PR1 vermittelt [BLAHO und HLA, 2014]. Darüber hinaus fördert S1P auch die Endothelzellmigration und die durch VEGF induzierte Gefäßbildung [LEE et al., 1999]. Außerdem ist S1PR1 zur Stabilisierung von Blutgefäßen erforderlich. Deshalb führt die Hemmung dieses Rezeptors bei S1PR1-knockout-Mäusen zu ausgedehnten Gefäßblutungen und einem letalen Phänotyp [LIU et al., 2000]. Die gleichen Effekte konnten bei SPHK1- und SPHK2-Knockout-Mäusen beobachtet werden [MIZUGISHI et al., 2005], was darauf hindeutet, dass S1P ein vielversprechendes Target für eine anti-angiogene Therapie sein könnte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Behandlung mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen S1P die Gefäßbildung in verschiedenen murinen Tumor-Modellen hemmt [VISENTIN et al., 2006]. *In vitro* und *in vivo* durchgeführte Experimente konnten zeigen, dass dies mit einer verringerten Freisetzung der pro-angiogenen Faktoren IL-6, IL-8 und VEGF verbunden ist. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass über diese Mechanismen auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete geringere Mikrogefäßdichte innerhalb SKI-5C-behandelter Endometrioseherde in ihrer frühen Entwicklungsphase verursacht wurde. Dass die Herde beider Gruppen an Tag 28 wieder eine vergleichbare Dichte von CD31-positiven Mikrogefäßen aufwies, könnte auf verschiedene Mechanismen bei der Vaskularisierung zurückzuführen sein. So wurde bereits der Mechanismus der Inoskulation im Endometriosemodell beobachtet [LASCHKE et al., 2010]. Dabei kommt es zu einer Verbindung von Blutgefäßen, die im Endometrioseherd vorhanden sind mit Gefäßen des umliegenden Gewebes. Umgekehrt können auch die Blutgefäße des umliegenden Gewebes in einen Endometrioseherd einwachsen und sich dort mit den internen Gefäßen zusammenschließen. Das Auftreten einer internen Inoskulation könnte zu einer erhöhten Mikrogefäßdichte führen.

Bei Erwachsenen findet die physiologische Angiogenese typischerweise im weiblichen Fortpflanzungssystem statt [REYNOLDS et al., 2002]. Dabei ist bekannt, dass S1P in der Follikelflüssigkeit die Proliferation von Endothelzellen und damit die Ausbildung neuer Blutgefäße während der Follikulogenese stimuliert [VON OTTE et al., 2006]. Außerdem ist die S1P-Signalübertragung an der Dezidualisierung menschlicher Stromazellen des Endometriums beteiligt und die Störung von beiden SPHK-Genen führt zu Defekten in dezidualen Blutgefäßen [MIZUGISHI et al., 2005]. Deshalb wurde

in der vorliegenden Arbeit auch untersucht, ob die Behandlung mit SKI-5C zu Nebenwirkungen im Uterus und den Ovarien führt. Dabei zeigten sich jedoch keine unterschiedliche Morphologie, Vaskularisierung und proliferative Aktivität in diesen Organen bei Vergleich zwischen Vehikel- und SKI-5C-behandelten Mäusen. Diese vorläufigen Ergebnisse legen nahe, dass die pharmakologische Hemmung von SPHK1 die Entwicklung von Endometrioseherden selektiv unterdrückt, ohne Morphologie und physiologische Funktion der weiblichen Fortpflanzungsorgane zu beeinträchtigen.

Zuletzt sollte noch berücksichtigt werden, dass die lokale Synthese von Östrogen durch eine Überexpression der Aromatase (CYP19A1) und des steroidogenen akuten regulatorischen Proteins (StaR) eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression einer Endometriose spielt [ATTAR et al., 2009]. Darüber hinaus ist für das Wachstum von Endometrioseherden auch die Aktivierung der beiden Östrogenrezeptor-Isomeren ER α und ER β erforderlich [BURNS et al., 2012]. Neuere Studien zeigen, dass Östrogen SPHK1 aktiviert [GUO et al., 2014], wodurch die S1P-Synthese und eine S1PR1-vermittelte Angiogenese gefördert wird [YOUNG und VAN BROCKLYN, 2006]. Obwohl dies in der vorliegenden Studie nicht weiter untersucht wurde, kann daher angenommen werden, dass die Unterdrückung der Entwicklung von Endometrioseherden nach Hemmung von SPHK1 durch Blockade des Östrogen-Signallings vermittelt ist.

7.2.3 SEW2871

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer S1PR1-Inhibition durch den selektiven S1PR1-Agonisten SEW2871 auf die Angiogenese und Entwicklung von Endometrioseherden untersucht. Im Modell der Rückenhautkammer wuchsen die transplantierten Endometriumfragmente sowohl in der Kontroll- als auch Behandlungsgruppe kontinuierlich, sodass die Transplantate am Versuchsende eine vergleichbare Größe aufwiesen. Entsprechend konnten in beiden Gruppen auch an Tag 14 keine unterschiedliche Proliferationsraten der Stromazellen festgestellt werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellproliferation hauptsächlich durch den S1PR3 vermittelt wird, auf den SEW2871 keinen Einfluss nimmt [WANG et al., 2018]. In einer Magenkrebsstudie im Mausmodell fand sich nach Einsatz von SEW2871 das Tumorwachstum nicht nur nicht gehemmt, sondern gar gefördert [ZHOU und GUO, 2018].

Von Beginn bis zum 10. Tag des Versuchs wurde eine leicht reduzierte Vaskularisierungsrate in der Behandlungsgruppe beobachtet, die jedoch keine statistische Signifikanz erlangte. Dieser potentielle anti-angiogene Effekt kann durch das Wirkspektrum des inhibierten S1PR1 begründet sein. So bezeichnen GAENGEL et al. [2012] den S1PR1 als zentrale Komponente eines biologischen Programms, das die angiogene Reaktionsfähigkeit in Gefäßen in einem Entwicklungsstadium unterdrückt, in dem eine Gefäßstabilisierung unerlässlich ist. Ihre Untersuchungen weisen zwei Mechanismen auf, durch die eine S1PR1-Signalgebung endotheliales Hypersprouting unterdrückt. Hierzu zählt einerseits die Stabilisierung der vaskulären endothelialen Verbindungen und andererseits die Hemmung der VEGF-Phosphorylierung und der nachgeschalteten Signalgebung. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Aktivierung von S1PR1 nicht nur einen Beitrag zur Gefäßstabilität leistet, sondern auch die vaskuläre Barrierefunktion aufrechterhält [HISANO und HLA, 2019]. Auch die bereits unter 3.3 beschriebene Studie von KONO et al. [2004] bestätigt die wichtige Funktion dieses Rezeptors bei der Angiogenese und erklärt, weshalb seine Inhibition die Angiogenese negativ beeinflusst.

Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied in der funktionalen Mikrogefäßdichte in den transplantierten Endometriumfragmenten der Kontroll- und Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Entsprechend zeigte auch die quantitative Erfassung der CD31-positiven Gefäße in den Endometrioseherden der Vehikel- und SEW2871-behandelten Mäuse keine Unterschiede an Tag 14.

Allerdings wiesen die SEW2871-behandelten Herde im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größere Gefäßdurchmesser auf. Dies kann als ein typisches Zeichen für eine gestörte Gefäßstabilisierung und -reifung bei der Entwicklung neuer mikrovaskulärer Netzwerke gedeutet werden [LASCHKE et al., 2014]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte bereits gezeigt werden, dass SEW2871 an der Gefäßstabilisierung beteiligt ist [MARMONTI et al., 2020].

Außerdem kann vermutet werden, dass die anfänglich reduzierte Vaskularisierung in den Endometrioseherden der Behandlungsgruppe eine Hypoxie verursachte, die wiederum Angiogenese und Zellproliferation induzierte und dadurch schlussendlich zu einer identischen Vaskularisierung der Herde in beiden Gruppen führte. So konnte bereits von RUDZITIS-AUTH et al. [2022] gezeigt werden, dass Hypoxie zu aggressiv wachsenden Endometrioseherden führen kann. Die Ergebnisse von SOLEIMANI et al.

[2011] sprechen jedoch gegen diese Vermutung. So konnten die Autoren zeigen, dass die Behandlung mit SEW2871 trotz einer massiven Gewebehypoxie mit einer reduzierten Gefäßdichte in transplantiertem Ovargewebe im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen einher ging.

Wie unter 7.2.2 bereits beschrieben, kann eine Störung des S1P-Signalwegs zu Defekten in den dezidualen Blutgefäßen des Endometriums führen [MIZUGISHI et al., 2005]. Deshalb wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die Behandlung mit SEW2871 einen Einfluss auf die Uteri und Ovarien hat. Dabei stellte sich heraus, dass es in der Morphologie, Vaskularisierung und Zellproliferation in diesen Geweben keinerlei Unterschiede zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe gab. Diese vorläufigen Ergebnisse legen nahe, dass der Einsatz von SEW2871 die physiologische Funktion der weiblichen Fortpflanzungsorgane nicht beeinträchtigt.

Insgesamt lassen die vorliegenden Ergebnisse darauf schließen, dass durch die Einwirkung von SEW2871 auf nur einen der insgesamt fünf S1PRs die Angiogenese und Zellproliferation in induzierten Endometrioseherden nicht effektiv gehemmt werden kann. Die Signalübertragung durch S1P über S1PR2-5 ist weiterhin aktiv und vermutlich ursächlich dafür, dass keine deutlichen Effekte von SEW2871 auf die Entwicklung der Endometrioseherde festgestellt werden konnten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einem letzten Studienabschnitt noch das FTY720 getestet, der aufgrund seiner S1P-Analogie an vier der fünf S1PRs binden kann.

7.2.4 FTY720

Im letzten Studienabschnitt wurde der inhibierende Effekt des S1P-Analogons FTY720 auf die S1P-Signalübertragung über die S1PRs 1 und 3-5 und dessen Einfluss auf die Angiogenese und Entwicklung von Endometrioseherden untersucht. Im Modell der Rückenhautkammer wuchsen die transplantierten Endometriumfragmente sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe kontinuierlich. Jedoch konnten in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas kleinere Herdgrößen gemessen werden, die am 10. Versuchstag statistisch signifikant waren. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass FTY720 einen hemmenden Einfluss auf Endometrioseherde hat. Bereits in mehreren Krebsstudien konnte nachgewiesen werden, dass FTY720 einen inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum ausübt, z. B. bei Prostatakrebs [Pchejetski et al., 2005], Brustkrebs [AZUMA et al., 2002] und Nierenkrebs [UBAI et al., 2007]. Eine mögliche Ursache für den wachstumshemmenden Effekt von FTY720

wurde von LIANG et al. [2013] bereits beschrieben. Sie fanden heraus, dass FTY720 die S1PR1-Expression verringert und dadurch die NF- κ B/IL-6-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) Amplifikationskaskade hemmt, die einen Einfluss auf die Proliferation und die Angiogenese hat. Dass NF- κ B die Entstehung einer Endometriose fördert, wurde bereits von ZHANG et al. [2010] postuliert. LU et al. [2014] kamen in einer Gallengangskarzinom-Studie zu dem gleichen Ergebnis und postulierten, dass STAT3 die Expression von jenen Genen reguliert, die zu einer unkontrollierten Tumorzellproliferation führen. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass der STAT-Signalweg und insbesondere die STAT3-Phosphorylierung im eutopen Endometrium von Endometriose-Patientinnen hochreguliert sind [KIM et al., 2015].

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von FTY720 auf die Zellproliferation des Stromas von Endometrioseherden untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Proliferationsrate in beiden Gruppen vergleichbar war. Dies könnte am Zelltyp liegen. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Einfluss von FTY720 auf den S1P-Signalweg nicht in allen Zelltypen gleich effektiv ist [MARTIN et al., 2017]. In dieser Studie wurde ebenfalls postuliert, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen proliferativer Aktivität von Zellen und ihrer SPHK1-Expression gibt [MARTIN et al., 2017].

Obwohl bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass FTY720 die Ausbildung von Gefäßnetzwerken hemmen kann, ergaben die fluoreszenzmikroskopischen Analysen dieser Arbeit, dass die Vaskularisierung der Endometrioseherde in der Behandlungsgruppe nicht inhibiert werden konnte. Die funktionelle Mikrogefäßdichte nahm bei beiden Gruppen in den Herden kontinuierlich zu, wobei in der FTY720-behandelten Gruppe sogar eine leicht höhere Dichte festgestellt wurde. Dies steht im Widerspruch zu dem, was von CHUA et al. [2005] berichtet wurde. Sie konnten zeigen, dass FTY720 die Expression von VEGF bei Prostatatumor-Xenotransplantaten in Nacktmäusen reduzieren kann. Außerdem zeigten LAMONTAGNE et al. [2006], dass FTY720 die durch VEGF und S1P induzierte Angiogenese in Tumoren signifikant hemmt.

Diese diskrepanten Ergebnisse können möglicherweise durch verschiedene Mechanismen, die an der Vaskularisierung von ektopen Endometriumfragmenten beteiligt sind, erklärt werden. So ist bekannt, dass die transplantierten Endometriumfragmente

aus Spendertieren bereits Mikrogefäße enthalten, die durch eine Verbindung mit den Gefäßen der Empfängertiere erneut durchblutet werden können, was man als Inoskulation bezeichnet [LASCHKE und MENGER, 2018]. Der Prozess der Inoskulation, welcher von CHENG et al. [2011] bereits für andere Gewebe beschrieben wurde, wird durch die Anordnung von Endothelzellen eines Spendertiergefäßes um ein durchblutetes Empfängertiergefäß eingeleitet. Dort setzen die Endothelzellen MMP-9 und -14 frei, was zum Endothelabbau und Einstrom von Blut in das vorgeformte Gefäßsegment des Spendertiers führt. Es ist davon auszugehen, dass in der vorliegenden Arbeit die Inoskulation durch FTY720 nicht unterdrückt wurde. So könnte nur eine erfolgreiche Gefäßverbindung bereits eine Blutperfusion von großen Teilen der vorgeformten mikrovaskulären Netzwerke innerhalb der Endometriumfragmente ermöglicht haben. Dies könnte erklären, warum die Mikrogefäßdichte in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht war.

Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass die Vaskularisierung von Endometrioseherden auch von der Vaskulogenese abhängt. Dabei werden aus dem Knochenmark stammende zirkulierende Vorläuferzellen in das mikrovaskuläre Endothel eingebaut [LASCHKE et al., 2011]. Dieser Prozess wird durch die Bindung des Chemokins stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) an seinen spezifischen Rezeptor CXCR4 vermittelt [VIRANI et al., 2013]. KIMURA et al. [2004] analysierten den Einfluss von FTY720 auf die SDF-1/CXCR4-vermittelten Effekte in hämatopoetischen Progenitorzellen (HPCs). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass FTY720 SDF-1 aktiviert und die Expression von CXCR4 steigert. Daraus kann abgeleitet werden, dass FTY720 über die SDF-1/CXCR4-Achse die Vaskulogenese fördert, was ebenfalls die erhöhte Mikrogefäßdichte in den Endometrioseherden der FTY720-behandelten Gruppe in der vorliegenden Arbeit erklären könnte.

Außerdem wurde in einer weiteren Studie von YI et al. [2022] der Einfluss von FTY720 auf syngene Fettallotransplantate getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine FTY720-Behandlung das Überleben der Transplantate aufgrund einer verbesserten Vaskularisierung signifikant förderte.

Ein weiterer Grund dafür, dass FTY720 die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden nicht effektiv hemmt, könnte mit der Funktion der inhibierten S1PRs begründet werden. Während für S1PR1 bekannt ist, dass er eine wichtige Funktion bei der embryonalen Angiogenese hat, zeigte sich ein alleiniger Knockout

von S1PR3 embryonal nicht letal. KLUK und HLA [2002] postulierten daher, dass S1PR2 den Verlust von S1PR3 durch seine strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten kompensieren kann und sein alleiniger Knockout deshalb ohne schwerwiegende Konsequenzen bleibt. S1PR4 ist vor allem im lymphatischen System dominant und S1PR4-Knockout-Mäuse sind nicht letal [GOLFIER et al., 2010]. S1PR5 ist der vorherrschende Typ der S1P-Rezeptoren und bei S1PR5-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass S1PR5 vor allem eine Rolle beim NK-Zelltransport spielt, sodass er hauptsächlich eine Bedeutung für die Immunreaktion hat [IM et al., 2000].

Dass eine Störung des S1P-Signalwegs zu Defekten in dezidualen Blutgefäßen des Endometriums führen kann, wurde bereits unter 7.2.2 und 7.2.3 beschrieben [MIZUGISHI et al., 2005]. Deshalb wurden schließlich auch in diesem Studienabschnitt die Uteri und Ovarien auf mögliche FTY720-bedingte Effekte untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass FTY720 keinen Einfluss auf die Morphologie, Vaskularisierung und Zellproliferation dieser Organe hat.

7.3 Schlussfolgerungen

Generell konnte in verschiedenen Studien bereits nachgewiesen werden, dass die S1P-Rezeptoren einen großen Einfluss auf das Überleben, die Proliferation, die Migration und die Differenzierung von Zellen haben. Deshalb stellen sie einen wichtigen Angriffspunkt für potenzielle Therapeutika zur Behandlung der Endometriose, Krebs und vielen anderen Krankheiten dar. Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind sie aufgrund ihrer Spezifität ideale Targets für neue Wirkstoffe und damit für die Arzneimittelentwicklung.

Die S1PRs haben verschiedene Funktionen und können Signale vermitteln, die in Abhängigkeit vom Zelltyp sowohl für als auch gegen das Überleben einer Zelle wirksam sein können. Deshalb ist es wichtig, in Abhängigkeit von der Erkrankung und den involvierten Zelltypen spezifische Antagonisten oder Agonisten für eine optimale Behandlung zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der niedermolekulare Inhibitor SKI-5C die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden hemmt. Diese neuen Ergebnisse deuten darauf hin, dass SKI-5C ein vielversprechender Kandidat für die künftige Behandlung der Endometriose sein könnte, wenn sich

dieser Wirkstoff klinisch als sicher erweist und ein tolerierbares Spektrum an Nebenwirkungen aufweist.

Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition von S1PR1 mittels SEW2871 sowie S1PR1 und 3-5 mittels FTY720 nicht effektiv genug ist, um die Entwicklung von Endometrioseherden zu hemmen.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wäre es sinnvoll, in weiteren Experimenten noch zusätzlich die Wirksamkeit eines Inhibitors zu testen, der auf S1PR2 einwirkt. So wurde in Tumorstudien bereits festgestellt, dass S1PR2 eine wichtige Funktion bei der Tumorentwicklung durch die Interaktion mit COX-2 zukommt. COX-2 wird z. B. in Wilms-Tumoren ubiquitär exprimiert [LI et al., 2009] und fördert die Vaskularisierung von Endometrioseherden [LASCHKE et al., 2007].

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit, dass der S1P-Signalweg eine wichtige regulatorische Funktion bei der Angiogenese und dem Wachstum von Endometrioseherden hat. In zukünftigen Studien sollte daher geklärt werden, wie die Inhibitoren dieses Signalweges möglichst effektiv und nebenwirkungsarm zur Behandlung der Endometriose genutzt werden könnte.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adamson GD [2011]** Endometriosis classification: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 23:213-220
2. **Allende ML, Proia RL [2002]** Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta* 1582:222-227
3. **Allhorn S, Böing C, Koch AA, Kimmig R, Gashaw I [2008]** TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 6:40
4. **Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstien S, Spiegel S [2010]** Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465:1084-1088
5. **Amsterdam LL, Gentry W, Jobanputra S, Wolf M, Rubin SD, Bulun SE [2005]** Anastrozole and oral contraceptives: a novel treatment for endometriosis. *Fertil Steril* 84:300-304
6. **Attar E, Tokunaga H, Imir G, Yilmaz MB, Redwine D, Putman M, Gurates B, Attar R, Yaegashi N, Hales DB, Bulun SE [2009]** Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 94:623-631
7. **Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, Wang JD, Itoh Y, Otsuki Y, Morimoto J, Fukui R, Hoshiga M, Ishihara T, Nonomura N, Suzuki S, Okuyama A, Katsuo Y [2002]** Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res* 62:1410-1419
8. **Bandhuvula P, Tam YY, Oskouian B, Saba JD [2005]** The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J Biol Chem* 280:33697-33700
9. **Barbieri RL, Ryan KJ [1981]** Danazol: endocrine pharmacology and therapeutic applications. *Am J Obstet Gynecol* 141:453-463
10. **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 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 172:534-544
11. **Bergqvist A, Bruse C, Carlberg M, Carlström K [2001]** Interleukin 1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in endometriotic tissue and in endometrium. *Fertil Steril* 75:489-495
 12. **Bischoff F, Simpson JL [2004]** Genetic basis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1034:284-299
 13. **Blaho VA, Hla T [2014]** An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res* 55:1596-1608
 14. **Brockmann MA, Kemmling A, Groden C [2007]** Current issues and perspectives in small rodent magnetic resonance imaging using clinical MRI scanners. *Methods* 43:79-87
 15. **Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R [2020]** ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol* 108:787-799
 16. **Bulun SE, Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Zhou J, Sebastian S [2001]** Role of aromatase in endometrial disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79:19-25
 17. **Bulun SE, Imir G, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Lin Z [2005]** Aromatase in endometriosis and uterine leiomyomata. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95:57-62
 18. **Burns KA, Rodriguez KF, Hewitt SC, Janardhan KS, Young SL, Korach KS [2012]** Role of estrogen receptor signaling required for endometriosis-like lesion establishment in a mouse model. *Endocrinology* 153:3960-3971
 19. **Caligioni CS [2009]** Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci Appendix 4*
 20. **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
 21. **Cheng G, Liao S, Kit Wong H, Lacorre DA, di Tomaso E, Au P, Fukumura D, Jain RK, Munn LL [2011]** Engineered blood vessel networks connect to host vasculature via wrapping-and-tapping anastomosis. *Blood* 118:4740-4749

22. **Chiba K [2005]** FTY720 a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosin 1-phosphate receptors. *Pharmacol Ther* 108:308-319
23. **Child TJ, Tan SL [2001]** Endometriosis: aetiology, pathogenesis and treatment. *Drugs* 61:1735-1750
24. **Chua CW, Lee DT, Ling MT, Zhou C, Man K, Ho J, Chan FL, Wang X, Wong YC [2005]** FTY720, a fungus metabolite, inhibits in vivo growth of androgen-independent prostate cancer. *Int J Cancer* 117:1039-1048
25. **Clark AH [1948]** Endometriosis in a young girl. *J Am Med Assoc* 136:690
26. **Coleman BG, Arger PH, Mulhern CB Jr [1979]** Endometriosis: clinical and ultrasonic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 132:747-749
27. **Dai L, Liu Y, Xie L, Wu X, Qiu L, Di W [2017]** Sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate [S1P]/S1P receptor axis is involved in ovarian cancer angiogenesis. *Oncotarget* 8:74947-74961
28. **Das A, Lenz SM, Awojodu AO, Botchwey EA [2015]** Abluminal stimulation of sphingosine 1-phosphate receptors 1 and 3 promotes and stabilizes endothelial sprout formation. *Tissue Eng Part A* 21:202-213
29. **Datta A, Loo SY, Huang B, Wong L, Tan SS, Tan TZ, Lee SC, Thiery JP, Lim YC, Yong WP, Lam Y, Kumar AP, Yap CT [2014]** SPHK1 regulates proliferation and survival responses in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 5:5920-5933
30. **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
31. **Dong J, Wang H, Wu G, Zhao J, Zhang L, Zuo L, Zhu W, Gong J, Li Y, Gu L, Li J [2014]** Oral treatment with SEW2871, a sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist, ameliorates experimental colitis in interleukin-10 gene deficient mice. *Clin Exp Immunol* 177:94-101
32. **Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M [1998]** Vascular endothelial growth factor [VEGF] in endometriosis. *Hum Reprod* 13:1686-1690
33. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K [1980]** Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med [Berl]* 177:125-134

34. **Ferriani RA, Charnock-Jones DS, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK [1993]** Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 8:11-16
35. **Folkman J [1984]** What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51:601-604
36. **Franchimont P, Cramilion C [1977]** The effect of danazol on anterior pituitary function. *Fertil Steril* 28:814-817
37. **Friesenecker B, Tsai AG, Allegra C, Intaglietta M [1994]** Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: in vivo observations in the hamster skin fold. *Int J Microcirc Clin Exp* 14:50-55
38. **Fujii Y, Ueda Y, Ohtake H, Ono N, Takayama T, Nakazawa K, Igarashi Y, Goitsuka R [2012]** Blocking S1P interaction with S1P₁ receptor by a novel competitive S1P₁-selective antagonist inhibits angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 419:754-760
39. **Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T [1994]** Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot [Tokyo]* 47:208-215
40. **Furuya H, Tamashiro PM, Shimizu Y, Iino K, Peres R, Chen R, Sun Y, Hannun YA, Obeid LM, Kawamori T [2017]** Sphingosine kinase 1 expression in peritoneal macrophages is required for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 38:1218-1227
41. **Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sundén Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N [2012]** The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest* 122:1416-1426
42. **Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Laviña B, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nyström S, Rymo S, Chen LL, Pang MF, Jin Y, Raschperger E, Roswall P, Schulte D, Benedito R, Larsson J, Hellström M, Fuxe J, Uhlén P, Adams R, Jakobsson L, Majumdar A, Vestweber D, Uv A, Betsholtz C [2012]** The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by

- regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev Cell* 23:587-599
43. **Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ [1989]** Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 37:1-15
 44. **Gezer A, Oral E [2015]** Progestin therapy in endometriosis. *Womens Health [Lond]* 11:643-652
 45. **Giudice LC, Kao LC [2004]** Endometriosis. *Lancet* 364:1789-1799
 46. **Golfier S, Kondo S, Schulze T, Takeuchi T, Vassileva G, Achtman AH, Graler MH, Abbondanzo SJ, Wiekowski M, Kremmer E, Endo Y, Lira SA, Bacon KB, Lipp M [2010]** Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB J* 24:4701-4710
 47. **González-Ramos R, Van Langendonck A, Defrère S, Lousse JC, Mettlen M, Guillet A, Donnez J [2008]** Agents blocking the nuclear factor-kappaB pathway are effective inhibitors of endometriosis in an in vivo experimental model. *Gynecol Obstet Invest* 65:174-186
 48. **González-Ramos R, Van Langendonck A, Defrère S, Lousse JC, Colette S, Devoto L, Donnez J [2010]** Involvement of the nuclear factor-kB pathway in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil Steril* 94:1985-1994
 49. **Gordon JD, Shifren JL, Foulk RA, Taylor RN, Jaffe RB [1995]** Angiogenesis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 50:688-697
 50. **Greaves E, Critchley HOD, Horne AW, Saunders PTK [2017]** Relevant human tissue resources and laboratory models for use in endometriosis research. *Acta Obstet Gynecol Scand* 96:644-658
 51. **Greenblatt RB, Dmowski WP, Mahesh VB, Scholer HF [1971]** Clinical studies with an antigonadotropin-Danazol. *Fertil Steril* 22:102-112
 52. **Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R [2005]** Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 8:147-156
 53. **Grümmer R [2006]** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12:641-649

54. **Grümmer R, Schwarzer F, Bainsczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E [2001]** Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 16:1736-1743
55. **Guo L, Ou X, Li H, Han Z [2014]** Roles of sphingosine-1-phosphate in reproduction. *Reprod Sci* 21:550-554
56. **Haas D, Shebl O, Shamiyeh A, Oppelt P [2013]** The rASRM score and the Enzian classification for endometriosis: their strengths and weaknesses. *Acta Obstet Gynecol Scand* 92:3-7
57. **Halis G, Mechsner S, Ebert A [2010]** The diagnosis and treatment of deep infiltrating endometriosis. *Dtsch Arztebl Int* 107:446-455
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. **Hasan SS, Tsaryk R, Lange M, Wisniewski L, Moore JC, Lawson ND, Wojciechowska K, Schnittler H, Siekmann AF [2017]** Endothelial Notch signalling limits angiogenesis via control of artery formation. *Nat Cell Biol* 19:928-940
60. **Hayes EC, Rock JA [2002]** COX-2 inhibitors and their role in gynecology. *Obstet Gynecol Surv* 57:768-780
61. **Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ [1983]** A study of the pharmacologic control of blood flow to delayed skin flaps using xenon washout. Part II. *Plast Reconstr Surg* 71:399-407
62. **Hisano Y, Hla T [2019]** Bioactive lysolipids in cancer and angiogenesis. *Pharmacol Ther* 193:91-98
63. **Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ [2001]** Lysophospholipids-receptor revelations. *Science* 294:1875-1878
64. **Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S [2001]** Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291:1800-1803
65. **Hudelist G, Oberwinkler KH, Singer CF, Tuttlies F, Rauter G, Ritter O, Keckstein J [2009]** Combination of transvaginal sonography and clinical examination for preoperative diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod* 24:1018-1024

66. **Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS [2005]** Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 20:350-358
67. **Im DS, Heise CE, Ancellin N, O'Dowd BF, Shei GJ, Heavens RP, Rigby MR, Hla T, Mandala S, McAllister G, George SR, Lynch KR [2000]** Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J Biol Chem* 275:14281-14286
68. **Jacobson TZ, Duffy JMN, Barlow D, Koninckx PR, Garry R [2009]** Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. Editorial Group: Cochrane Menstrual Disorders and Subfertility Group. *Cochrane Database Syst Rev* CD001300
69. **Jansen RP, Russell P [1986]** Nonpigmented endometriosis: clinical, laparoscopic, and pathological definition. *Am J Obstet Gynecol* 155:1154-1159
70. **Jo E, Sanna MG, Gonzalez-Cabrera PJ, Thangada S, Tigyi G, Osborne DA, Hla T, Parrill AL, Rosen H [2005]** S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. *Chem Biol* 12:703-715
71. **Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM [2003]** Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J Biol Chem* 278:34541-34547
72. **Johnson MC, Torres M, Alves A, Bacallao K, Fuentes A, Vega M, Boric MA [2005]** Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* 3:45
73. **Jouannot E, Duong-Van-Huyen JP, Bourahla K, Laugier P, Lelievre-Pegorier M, Bridal L [2006]** High-frequency ultrasound detection and follow-up of Wilms' tumor in the mouse. *Ultrasound Med Biol* 32:183-190
74. **Kanzaki H, Wang HS, Kariya M, Mori T [1992]** Suppression of natural killer cell activity by sera from patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 167:257-261
75. **Kaponis A, Iwabe T, Taniguchi F, Ito M, Deura I, Decavalas G, Terakawa N, Harada T [2012]** The role of NF-kappaB in endometriosis. *Front Biosci [Schol Ed]* 4:1213-1234

76. **Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, Hummelshoj L, Prentice A, Saridogan E [2005]** ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. ESHRE Special Interest Group for Endometriosis and Endometrium Guideline Development Group. *Hum Reprod* 20:2698-2704
77. **Kim BG, Yoo JY, Kim TH, Shin JH, Langenheim JF, Ferguson SD, Fazleabas AT, Young SL, Lessey BA, Jeong JW [2015]** Aberrant activation of signal transducer and activator of transcription-3 [STAT3] signaling in endometriosis. *Hum Reprod* 30:1069-1078
78. **Kim HS, Yoon G, Ryu JY, Cho YJ, Choi JJ, Lee YY, Kim TJ, Choi CH, Song SY, Kim BG, Bae DS, Lee JW [2015]** Sphingosine kinase 1 is a reliable prognostic factor and a novel therapeutic target for uterine cervical cancer. *Oncotarget* 6:26746-26756
79. **Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, Kuçi S, Wiesner T, Brinkmann V, Kanz L, Möhle R [2004]** The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells. *Blood* 103:4478-4486
80. **Kitawaki J, Noguchi T, Amatsu T, Maeda K, Tsukamoto K, Yamamoto T, Fushiki S, Osawa Y, Honjo H [1997]** Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium. *Biol Reprod* 57:514-519
81. **Kluk MJ, Hla T [2002]** Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582:72-80
82. **Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H [1997]** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech [Berl.]* 42:168-175
83. **Koga K, Osuga Y, Takemura Y, Takamura M, Taketani Y [2013]** Recurrence of endometrioma after laparoscopic excision and its prevention by medical management. *Front Biosci [Elite Ed]* 5:676-683
84. **Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, Yamashita T, Proia RL [2004]** The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem* 279:29367-29373

85. **Körbel C, Gerstner MD, Menger MD, Laschke MW [2018]** Notch signaling controls sprouting angiogenesis of endometriotic lesions. *Angiogenesis* 21:37-46
86. **LaMontagne K, Littlewood-Evans A, Schnell C, O'Reilly T, Wyder L, Sanchez T, Probst B, Butler J, Wood A, Liao G, Billy E, Theuer A, Hla T, Wood J [2006]** Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization. *Cancer Res* 66:221-231
87. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD [2006]** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149:137-144
88. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD [2007]** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87:163-171
89. **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
90. **Laschke MW, Schwender C, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD [2008]** Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. *Hum Reprod* 23:2308-2318
91. **Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD [2010]** Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater* 20:356-366
92. **Laschke MW, Giebels C, Nickels RM, Scheuer C, Menger MD [2011]** Endothelial progenitor cells contribute to the vascularization of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 178:442-450
93. **Laschke MW, Grässer C, Kleer S, Scheuer C, Eglin D, Alini M, Menger MD [2014]** Adipose tissue-derived microvascular fragments from aged donors exhibit an impaired vascularisation capacity. *Eur Cell Mater* 28:287-298
94. **Laschke MW, Menger MD [2018]** Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update* 24:207-224

95. **Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN [2001]** Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 75:1-10
96. **Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T [1999]** Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99:301-312
97. **Leiber D, Banno Y, Tanfin Z [2007]** Exogenous sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinase activated by endothelin-1 induced myometrial contraction through differential mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C240-250
98. **Levander G, Normann P [1955]** The pathogenesis of endometriosis; an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 34:366-398
99. **Li MH, Sanchez T, Milne GL, Morrow JD, Hla T, Ferrer F [2009]** S1P/S1P2 signaling induces cyclooxygenase-2 expression in Wilms tumor. *J Urol* 181:1347-1352
100. **Li PH, Wu JX, Zheng JN, Pei DS [2014]** A sphingosine kinase-1 inhibitor, SKI-II, induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:10381-10385
101. **Li ZH, Tao YF, Xu LX, Zhao H, Li XL, Fang F, Wu Y, Lu J, Li YH, Du WW, Ren JL, Li YP, Xu YY, Feng X, Wang J, He WQ, Pan J [2016]** A novel sphingosine kinase 1 inhibitor [SKI-5C] induces cell death of Wilms' tumor cells in vitro and in vivo. *Am J Transl Res* 8:4548-4563
102. **Liang J, Nagahashi M, Kim EY, Harikumar KB, Yamada A, Huang WC, Hait NC, Allegood JC, Price MM, Avni D, Takabe K, Kordula T, Milstien S, Spiegel S [2013]** Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 23:107-120
103. **Lien YH, Yong KC, Cho C, Igarashi S, Lai LW [2006]** S1P1-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 69:1601-1608
104. **Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL [2000]** Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106:951-961
105. **Lu Z, Wang J, Zheng T, Liang Y, Yin D, Song R, Pei T, Pan S, Jiang H, Liu L [2014]** FTY720 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma by inactivating STAT3 signaling. *BMC Cancer* 14:783

106. **Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S [2012]** Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol* 22:50-60
107. **Marmonti E, Savage H, Zhang A, Bedoya CAF, Morrell MG, Harden A, Buzbee M, Schadler K [2020]** Modulating sphingosine-1-phosphate receptors to improve chemotherapy efficacy against Ewing sarcoma. *Int J Cancer* 147:1206-1214
108. **Martin JL, Julovi SM, Lin MZ, de Silva HC, Boyle FM, Baxter RC [2017]** Inhibition of basal-like breast cancer growth by FTY720 in combination with epidermal growth factor receptor kinase blockade. *Breast Cancer Res* 19:90
109. **Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Al-lende ML, Proia RL, Cyster JG [2004]** Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427:355-360
110. **Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Yokomizo R, Noda T, Kimura Y, Okamura K [2001]** Erythropoietin concentrations are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 16:945-948
111. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK [1996]** Vascular endothelial growth factor [VEGF] concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 11:220-223
112. **McLaren J [2000]** Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 6:45-55
113. **Menger MD, Barker JH, Messmer K [1992]** Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast Reconstr Surg* 89:1104-1114
114. **Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B [1999]** Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 46 Suppl 2:1452-1457
115. **Meuleman C, Tomassetti C, Gaspar Da Vitoria Magro M, Van Cleynenbreugel B, D'Hoore A, D'Hooghe T [2013]** Laparoscopic treatment of endometriosis. *Minerva Ginecol* 65:125-142
116. **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
117. **Missmer SA, Cramer DW [2003]** The epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30:1-19

118. **Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL [2005]** Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol* 25:11113-11121
119. **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
120. **Nawroth F, Rahimi G, Nawroth C, Foth D, Ludwig M, Schmidt T [2006]** Is there an association between septate uterus and endometriosis? *Hum Reprod* 21:542-544
121. **Ngô C, Chéreau C, Nicco C, Weill B, Chapron C, Batteux F [2009]** Reactive oxygen species controls endometriosis progression. *Am J Pathol* 175:225-234
122. **Nolan DJ, Ciarrocchi A, Mellick AS, Jaggi JS, Bambino K, Gupta S, Heikamp E, McDevitt MR, Scheinberg DA, Benezra R, Mittal V [2007]** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev* 21:1546-1558
123. **Olive DL, Schwartz LB [1993]** Endometriosis. *N Engl J Med* 328:1759-1769
124. **Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR [1991]** Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56:45-51
125. **Paik JH, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, Hla T [2004]** Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vessel stabilization. *Genes Dev* 18:2392-2403
126. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA [1979]** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18:311-318
127. **Pchejetski D, Golzio M, Bonhoure E, Calvet C, Doumerc N, Garcia V, Mazerolles C, Rischmann P, Teissie J, Malavaud B, Cuvillier O [2005]** Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res* 65:11667-11675
128. **Penning LC, Dubbelman TM [1994]** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 5:139-146
129. **Peterse D, Binda MM, O DF, Vanhie A, Fassbender A, Vriens J, D'Hooghe TM [2018]** Of mice and women: a laparoscopic mouse model for endometriosis. *J Minim Invasive Gynecol* 25:578-579

130. **Phng LK, Gerhardt H [2009]** Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* 16:196-208
131. **Pickersgill A [1998]** GnRH agonists and add-back therapy: is there a perfect combination? *Br J Obstet Gynaecol* 105:475-485
132. **Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP [1983]** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 110:148-160
133. **Pyne NJ, Pyne S [2010]** Sphingosine-1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 10:489-503
134. **Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA [2002]** Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int J Exp Pathol* 83:151-163
135. **Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Barañao RI [2011]** Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci* 18:614-622
136. **Rocha AL, Reis FM, Taylor RN [2013]** Angiogenesis and endometriosis. *Obstet Gynecol Int* 2013:859619
137. **Rudzitis-Auth J, Körbel C, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW [2012]** Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Hum Reprod* 27:1735-1744
138. **Rudzitis-Auth J, Menger MD, Laschke MW [2013]** Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in experimental endometriosis. *Hum Reprod* 28:1339-1347
139. **Rudzitis-Auth J, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW [2018]** Inhibition of Cyclooxygenase-2 suppresses the recruitment of endothelial progenitor cells in the microvasculature of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 188:450-460
140. **Rudzitis-Auth J, Fuß SA, Becker V, Menger MD, Laschke MW [2020]** Inhibition of erythropoietin-producing hepatoma receptor B4 [EphB4] signalling suppresses the vascularisation and growth of endometriotic lesions. *Br J Pharmacol* 177:3225-3239
141. **Rudzitis-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

142. **Rudzitis-Auth J, Becker M, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW [2022]** Indole-3-Carbinol Inhibits the Growth of Endometriotic Lesions by Suppression of Microvascular Network Formation. *Nutrients* 14:4940
143. **Rumzhum NN, Rahman MM, Oliver BG, Ammit AJ [2016]** Effect of sphingosine 1-phosphate on cyclo-oxygenase-2 expression, prostaglandin E2 secretion, and β 2-adrenergic receptor desensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 54:128-135
144. **Russell WW [1979]** Aberrant portions of the müllerian duct found in an ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 134: 225-226
145. **Russell WMS, Burch R [1959]** The principles of humane experimental technique. *Methuen & Co Ltd., London, Great Britain*
146. **Sampson JA [1927a]** Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14:422-469
147. **Sampson JA [1927b]** Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 3:93-110
148. **Santulli P, Marcellin L, Noël JC, Borghese B, Fayt I, Vaiman D, Chapron C, Méhats C [2012]** Sphingosine pathway deregulation in endometriotic tissues. *Fertil Steril* 97:904-911
149. **Scarselli G, Rizzello F, Cammilli F, Ginocchini L, Coccia ME [2005]** Diagnosis and treatment of endometriosis. A review. *Minerva Ginecol* 57:55-78
150. **Schmid G, Guba M, Papyan A, Ischenko I, Brückel M, Bruns CJ, Jauch KW, Graeb C [2005]** FTY720 inhibits tumor growth and angiogenesis. *Transplant Proc* 37:110-111
151. **Schrodt G, Alcorn M, Ibanez J [1980]** Endometriosis of the male urinary system – A case report. *J Urol* 124:722-723
152. **Schuchardt M, Tölle M, Prüfer J, van der Giet M [2011]** Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system. *Br J Pharmacol* 163:1140-1162
153. **Shoham A, Malkinson G, Krief S, Shwartz Y, Ely Y, Ferrara N, Yaniv K, Zelzer E [2012]** S1P1 inhibits sprouting angiogenesis during vascular development. *Development* 139:3859-3869

154. **Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D [2002]** Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 22:7758-7768
155. **Soleimani R, Heytens E, Oktay K [2011]** Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One* 6:e19475
156. **Somigliana E, Viganò P, Vignali M [1999]** Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update* 5:40-51
157. **Spiegel S, Milstien S [2002]** Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* 277:25851-25854
158. **Steinbauer M, Harris AG, Leiderer R, Abels C, Messmer K [1998]** Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock* 9:345-351
159. **Surrey ES, Halme J [1991]** Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation in vitro: a model for endometriosis? *Fertil Steril* 56:672-679
160. **Suzumori N, Zhao XX, Suzumori K [2004]** Elevated angiogenin levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis correlate with the extent of the disorder. *Fertil Steril* 82:93-96
161. **Takasaki T, Hagihara K, Satoh R, Sugiura R [2018]** More than just an immunosuppressant: the emerging role of FTY720 as a novel inducer of ROS and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2018:4397159
162. **Tian T, Tian W, Yang F, Zhao R, Huang Q, Zhao Y [2016]** Sphingosine kinase 1 inhibition improves lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure by inhibiting mitogen-activated protein kinases pathway. *United European Gastroenterol J* 4:677-685
163. **Tölle M, Klöckl L, Wiedon A, Zidek W, van der Giet M, Schuchardt M [2016]** Regulation of endothelial nitric oxide synthase activation in endothelial cells by S1P1 and S1P3. *Biochem Biophys Res Commun* 476:627-634
164. **Ubai T, Azuma H, Kotake Y, Inamoto T, Takahara K, Ito Y, Kiyama S, Sakamoto T, Horie S, Muto S, Takahara S, Otsuki Y, Katsuoka Y [2007]** FTY720 induced Bcl-associated and Fas-independent apoptosis in human renal

- cancer cells in vitro and significantly reduced in vivo tumor growth in mouse xenograft. *Anticancer Res* 27:75-88
165. **Venkataraman K, Lee YM, Michaud J, Thangada S, Ai Y, Bonkovsky HL, Parikh NS, Habrukowich C, Hla T [2008]** Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res* 102:669-676
166. **Viganó P, Pardi R, Magri B, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M [1994]** Expression of intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1] on cultured human endometrial stromal cells and its role in the interaction with natural killers. *Am J Reprod Immunol* 32:139-145
167. **Virani S, Edwards AK, Thomas R, Childs T, Tayade C [2013]** Blocking of stromal cell-derived factor-1 reduces neoangiogenesis in human endometriosis lesions in a mouse model. *Am J Reprod Immunol* 70:386-397
168. **Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, Garland WA, Lu Y, Yu S, Hall HS, Kundra V, Mills GB, Sabbadini RA [2006]** Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9:225-238
169. **von Otte S, Paletta JR, Becker S, König S, Fobker M, Greb RR, Kiesel L, Assmann G, Diedrich K, Nofer JR [2006]** Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *J Biol Chem* 281:5398-5405
170. **Wang H, Cai KY, Li W, Huang H [2015]** Sphingosine-1-phosphate induces the migration and angiogenesis of epcs through the Akt signaling pathway via sphingosine-1-phosphate receptor 3/platelet-derived growth factor receptor- β . *Cell Mol Biol Lett* 20:597-611
171. **Wang H, Huang H, Ding SF [2018]** Sphingosine-1-phosphate promotes the proliferation and attenuates apoptosis of endothelial progenitor cells via S1PR1/S1PR3/PI3K/Akt pathway. *Cell Biol Int* 42:1492-1502
172. **Wang S, Liang Y, Chang W, Hu B, Zhang Y [2018]** Triple negative breast cancer depends on sphingosine kinase 1 [SphK1]/sphingosine-1-phosphate [S1P]/sphingosine-1-phosphate receptor 3 [S1PR3]/notch signaling for metastasis. *Med Sci Monit* 24:1912-1923
173. **Wheeler JM [1989]** Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med* 34:41-46

174. **Wong L, Tan SS, Lam Y, Melendez AJ [2009]** Synthesis and evaluation of sphingosine analogues as inhibitors of sphingosine kinases. *J Med Chem* 52:3618-3626
175. **Wu Y, Ip JE, Huang J, Zhang L, Matsushita K, Liew CC, Pratt RE, Dzau VJ [2006]** Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res* 99:315-322
176. **Yester JW, Tizazu E, Harikumar KB, Kordula T [2011]** Extracellular and intracellular sphingosine-1-phosphate in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30:577-597
177. **Yi Y, Hu WJ, Zhao CR, Xiong MC, Zhang Q, Wu YP, Zeng H, Zeng N [2022]** The protective role of FTY720 in promoting survival of allograft fat in mice. *Kaohsiung J Med Sci* 38:889-896
178. **Yoshino O, Yamada-Nomoto K, Kano K, Ono Y, Kobayashi M, Ito M, Yoneda S, Nakashima A, Shima T, Onda T, Osuga Y, Aoki J, Saito S [2019]** Sphingosine 1 phosphate [S1P] increased IL-6 expression and cell growth in endometriotic cells. *Reprod Sci* 26:1460-1467
179. **Young N, Van Brocklyn JR [2006]** Signal transduction of sphingosine-1-phosphate G protein-coupled receptors. *Sci World J* 6:946-966
180. **Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE [1998]** Deficient 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: failure to metabolize 17beta-estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4474-4480
181. **Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S [1991]** Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 114:155-167
182. **Zhang H, Zhao X, Liu S, Li J, Wen Z, Li M [2010]** 17betaE2 promotes cell proliferation in endometriosis by decreasing PTEN via NFkappaB-dependent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 317:31-43
183. **Zhang L, Wang HD, Ji XJ, Cong ZX, Zhu JH, Zhou Y [2013]** FTY720 for cancer therapy [Review]. *Oncol Rep* 30:2571-2578
184. **Zhang N, Qi Y, Wadham C, Wang L, Warren A, Di W, Xia P [2010]** FTY720 induces necrotic cell death and autophagy in ovarian cancer cells: a protective role of autophagy. *Autophagy* 6:1157-1167

185. **Zhou Y, Guo F [2018]** A selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW-2871 aggravates gastric cancer by recruiting myeloid-derived suppressor cells. *J Biochem* 163:77-83
186. **Zito G, Luppi S, Giolo S, Martinelli M, Venturin I, Di Lorenzo G, Ricci G [2014]** Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain. *Biomed Res Int* 2014:191967
187. **Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K [1991]** Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med [Berl]* 191:47-63

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 zur Durchführung 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 für das Kümmern um meine Versuchstiere.

Meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und motiviert haben, danke ich von ganzem Herzen.

10 LEBENS LAUF

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

11 PUBLIKATION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind teilweise in folgender Originalpublikation zusammengefasst:

Rudzitis-Auth J, **Christoffel A**, Menger MD, Laschke MW [2021] Targeting sphingosine kinase-1 with the low MW inhibitor SKI-5C suppresses the development of endometriotic lesions in mice. *Br J Pharmacol* 178:4104-4118