

Aus dem Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie,
und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Entwicklung eines in vivo-Modells
in der Nacktmaus und der NOD-SCID Maus zur
Untersuchung der humanen Endometriose

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
KATJA BAINCZYK

Gießen 2001

Aus dem Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Essen

Betreuer: Prof. Dr. E. Winterhager

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie,
und Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser

Entwicklung eines in vivo-Modells
in der Nacktmaus und der NOD-SCID Maus zur
Untersuchung der humanen Endometriose

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

KATJA BAINCZYK

Tierärztin aus Essen

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Winterhager

2. Berichterstatter: Prof Dr. Dr. h. c. R. Leiser

Tag der mündlichen Prüfung: 18. April 2001

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	3
2 Material und Methoden	4
2.1 Patientinnen und Gewebeentnahme	4
2.1.1 Vorkultur	4
2.2 Tierversuche	5
2.2.1 Verwendete Tierart	5
2.2.1.1 Nacktmäuse	5
2.2.1.2 NOD-SCID Mäuse	5
2.2.2 Behandlungen	5
2.2.2.1 Ovarektomie	5
2.2.2.2 Hormonsubstituierung	6
2.2.2.3 Implantation von menschlichen Endometriumsfragmenten in Nacktmäuse	6
2.3 Lichtmikroskopie	7
2.3.1 Fixierung und Einbettung	7
2.3.2 Schnitttechnik und histologische Färbungen	7
2.4 Immunhistochemie	8
2.4.1 Proliferationsmarker Ki67	8
2.4.2 Estrogen- und Progesteronrezeptoren	9
2.5 Zusammensetzung verwendeter Lösungen	10
2.5.1 Chemikalien	10
3. Ergebnisse	12
3.1 Lokalisation und Morphologie der Endometriumsfragmente	12

3.1.1	Transplantation in zyklische Nacktmäuse	12
3.1.2	Transplantation in zyklische NOD-SCID Mäuse	13
3.1.3	Transplantation in ovariectomisierte Nacktmäuse mit und ohne Östrogen	13
3.1.3.1	Vorkultur der Endometriumsfragmente	14
3.2	Proliferation der Endometriumsfragmente nach Kultur in Nackt- und NOD-SCID Mäusen	15
3.3	Expression von Estrogen- und Progesteronrezeptoren in den Endometriumfragmenten nach Kultur in Nackt- und NOD-SCID Mäusen	16
3.4	Invasion der endometrialen Fragmente in das Wirtsgewebe und Angiogenese der Fragmente	16
3.5	Abbildungen	18
3.6	Tabellen	28
4.	Diskussion	31
4.1	Lokalisation und Anheftungsrate der Endometriumsfragmente	31
4.2	Morphologie der ektopischen Endometrien	33
4.3	Einfluß von Steroidhormonen auf Morphologie, Expression von Steroidhormonrezeptoren und Proliferation des ektopischen Endometriums	34
4.4	Invasion und Angiogenese	35
5.	Zusammenfassung	37
6.	Summary	38
7.	Literaturverzeichnis	39

1 EINLEITUNG

Die Endometriose ist eine gutartige gynäkologische Erkrankung, die durch das Auftreten von endometrialem Gewebe außerhalb des Uterus charakterisiert ist. Man geht davon aus, daß Endometriose durch eine retrograde Menstruation entsteht, wodurch endometriale Fragmente und Zellen in die Bauchhöhle gelangen und sich implantieren (Liu et al. 1986). Als weitere Entstehungstheorien werden die ortsständige Neubildung, die Abstammung von den Müllerschen Gängen und Neubildung aus Mesothelzellen (Meyer, 1903; Geipel, 1927) sowie die vaskuläre und lymphogene Verschleppung diskutiert (Javert, 1949).

Die Lokalisation der Endometriose kann nach Kistner et al. (1977) in zwei Gruppen unterteilt werden. Die peritoneale Endometriose umfaßt die Anheftungsstellen von endometrialem Gewebe am Ovar, an der Uterusserosa, an den Ligamenta uteri, an den Tuben sowie an Dick- und Dünndarm. Auch im Bereich des Nabels und alter Laparatomienarben ist das Vorkommen peritonealer Endometriosen bekannt.

Von dieser Gruppe unterschieden wird die extraperitoneale Endometriose, hier sind die Lokalisationen vor allem im Bereich der Zervix, der Vagina und Vulva sowie in der Dammregion. Obwohl die Endometrioseherde meist ein relativ geringes Ausmaß haben, führt vor allem die peritoneale Endometriose zu schwerwiegenden klinischen Symptomen wie sekundäre Dysmenorrhö, Dyspareunie, zyklische/azyklische Beckenschmerzen (Barbieri, 1988; Schweppe et al. 1990; Schindler, 1995), Zyklusunregelmäßigkeiten, Dysurie, Dysdefäkation bzw. Darmkrämpfe und ist mit einer hohen Inzidenz von Infertilität verbunden (Ledger 1999).

Die Behandlung der Endometriose erfolgt zum einen durch eine Hormontherapie, im Allgemeinen unter der Verwendung von GnRH-Analoga, die zu einer Hemmung der LH- und FSH-Sekretion durch die Hypophyse und damit zum Erliegen des Menstruationszyklus führen. Hierdurch kommt es zu einer Atrophie der Endometrioseherde. Zumeist werden die Endometrioseherde zusätzlich chirurgisch entfernt.

Sowohl nach zunächst erfolgreicher hormoneller als auch chirurgischer Behandlung kommt es jedoch mit sehr hoher Inzidenz zu Rezidiven (Wheeler et al. 1993).

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß bereits das entope Endometrium dieser Patientinnen einen veränderten Differenzierungsstatus aufweist. Diese Hypothese wird durch den Befund unterstützt, daß die Endometriose in etwa 60 % der Fälle mit Infertilität einhergeht (Ledger 1999) und daß die retrograde Menstruation, die sehr verbreitet ist (Liu et al. 1986), nicht zwangsläufig zur Entstehung von ektopen endometrialen Läsionen führt.

Einige Untersuchungen konnten bereits eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie der Integrine (Lessey et al. 1997, Regidor et al. 1998) sowie von E-cadherin und Kateninen (Gaetje et al. 1997, Scotti et al. 2000) in den Endometrien von erkrankten Patientinnen aufzeigen.

Obwohl die Endometriose als eine häufige gynäkologische Erkrankung gilt (Wheeler 1989), ist das Wissen bezüglich der Ätiologie, der Pathogenese und des Krankheitsverlaufes nach wie vor relativ gering. Alle therapeutischen Maßnahmen führen bisher nicht zu einer vollständigen Heilung der Endometriose. Neue zellbiologische Grundlagen müssen erarbeitet werden, um zu erfolgreichen Therapieansätzen zu finden. Da der experimentelle Zugang nicht möglich ist, müssen möglichst nah an der in vivo Situation Modelle geschaffen werden, basierend auf neuen Erkenntnissen, um neue Therapien überprüfen zu können. Hier ist es erstrebenswert, geeignete Tiermodelle zur Verfügung zu haben, an denen die zellbiologischen Grundlagen zur Pathogenese der Endometriose untersucht sowie neue Therapieansätze entwickelt werden können. Da die Entstehung dieser Krankheit jedoch mit dem Vorhandensein eines Menstruationszyklus einhergeht, ist das Vorkommen von Endometriose auf den Menschen und nahe verwandten Primaten beschränkt (MacKenzie et al. 1975).

Versuche am Menschen verbieten sich jedoch aus ethischen Gründen, und Experimente an anderen Primaten sind mit einem erheblichen Kostenaufwand verbunden. Es wurden Versuchsansätze beschrieben, in denen bei Mäusen, die endometriales Gewebe nicht spontan abstoßen, eine operative Transplantation von endometrialem Gewebe an ektopischen Lokalisationen des Abdomens erfolgt.

Solche Versuchsreihen werden dadurch limitiert, daß eine immunologische Reaktion des Tieres auf das Transplantat wirkt und das humane Gewebe abgestoßen wird.

Aus diesem Grund werden hier zur Etablierung eines solchen Modells immundefiziente Mäuse verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde humanes Endometriums-

gewebe zum einen in die Bauchhöhle von Nacktmäusen transplantiert. Durch ihre angeborene Aplasie des Thymus bedingt, haben die Nacktmäuse ein defizientes T-Lymphozyten System (Wortis, 1971).

Die Ausbildung der B-Lymphozyten ist allerdings nach wie vor vorhanden, so daß die Nacktmäuse noch eine Restimmunität besitzen. Ein viel stärker reduziertes Immunsystem weisen die NOD-SCID Mäuse auf, die im Vergleich zu den Nacktmäusen auf ihre Eignung als Modell zur Untersuchung der Endometriose in dieser Arbeit eingesetzt wurden. NOD-SCID Mäuse sind durch ein angeborenes Defizit von T- und B-Lymphozytenfunktion charakterisiert und wurden bereits als erfolgreiche Wirtstiere für verschiedene Heterotransplantate beschrieben (Phillips et al. 1989).

Erfolgreiche Implantationen von endometrialem Gewebe auf dem Peritoneum von Nacktmäusen wurden bei Zamah et al. (1984) beobachtet. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt darauf gelegt, ohne jegliche Fixierung der Endometriumsfragmente bzw. ohne eine zusätzliche Gabe von Peritonealflüssigkeit der Patientinnen einen zeitlichen Ablauf hinsichtlich der Adhäsivität, der Invasivität und der Entwicklung des implantierten Endometriums zu untersuchen und zu validieren.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Endometriosemodell in immundefizienten Mäusen zu entwickeln und seine Validation für experimentelle Therapieansätze zu überprüfen. Aus diesem Grund sollten Wachstum, Differenzierung und Dedifferenzierung der peritonealen Endometrioseherde untersucht werden, um den Zeitrahmen für zukünftige zellbiologische Grundlagenforschung festzulegen.

Das Wachstum der ektopischen Endometriumsfragmente in der Maus soll als verlässliches Modell zur Testung neuer Substanzen und Reagenzien und deren zellbiologische Wirkungsweise eingesetzt werden können

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientinnen und Gewebeentnahme

Menschliches Endometriumgewebe stammte zum einen aus Kürettage-, zum anderen aus Hysterektomiematerial von Patientinnen vor der Menopause, die sich in der beginnenden oder abklingenden Proliferationsphase befanden (Diagnose: Uterus myomatosus bzw. Descensus uteri; Gynäkologische und Geburtshilfliche Abteilung der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen, Prof. Schindler). Das Abstrichmaterial wurde sofort nach der Entnahme in sterile 50 ml Falcon Tubes mit sterilem Nährmedium DMEM/F12/FCS (Dulbecco MEM/HAM'S F12(1:1)/fetales Kälberserum (10 %) und Pen/Strep) verbracht. Das Hysterektomiematerial wurde nach der Eröffnung des Corpus uteri mittels eines sterilen Skalpelles aus dem Lumen uteri entnommen und sofort in steriles Nährmedium (s. o.) überführt.

Unter einer Laminar-Flow Sterilbank (Nuaire, Plymouth) wurden die Gewebeproben auf einer sterilen Kunststoffplatte mit einem Skalpell in Fragmente von etwa 1 mm x 1 mm Kantenlänge geschnitten. Von jeder Patientin wurde ein Gewebefragment in 4 % igem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet, um eine Absicherung der Zyklusdiagnostik zu gewährleisten und einen späteren Vergleich des Ausgangsgewebes mit dem transplantierten Gewebe vornehmen zu können.

2.1.1 Vorkultur

Das Endometriumgewebe wurde wie unter 2.1 beschrieben gewonnen. Anschließend erfolgte eine Vorkultur der Fragmente für 24 Stunden auf mit Agar beschichteten Petrischalen (Grümmer 1994). Verwendet wurden Petrischalen aus Plastik mit einem Durchmesser von 3,5 cm (Falcon). Zur Herstellung des Nährbodens wurde 1 g Agar mit 25 ml destilliertem Wasser autoklaviert, nach Abkühlen der Masse auf circa 50°C wurden 25 ml steriles Kulturmedium (DMEM/F12/OHNE FCS) dazugegeben und jeweils 3-4 ml dieses Gemisches in eine Petrischale gegossen. Nach etwa 30 Minuten war das Agarmedium in den Petrischalen abgekühlt und erstarrt. Die Endometriumsfragmente wurden nun auf den Agar gegeben und mit Kulturmedium (DMEM/F12/FCS (s.

o.)) überschichtet, welchem vom Beginn der Kultur an 300 pg 17 β -Östradiol/ml Medium zugesetzt wurde.

2.2 Tierversuche

2.2.1 Verwendete Tierart

2.2.1.1 Nacktmäuse

Die Nacktmäuse des Stammes Han NMRI/nu/nu wurden im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gezüchtet. Für die Versuche wurden weibliche Nacktmäuse, die zu Beginn der Versuche ein Alter von circa drei Wochen erreicht hatten, verwendet. In den Käfigen saßen maximal fünf Tiere zusammen. Die Einstreu sowie das Futter wurden autoklaviert.

2.2.1.2 NOD-SCID Mäuse

Die NOD-SCID Mäuse wurden im Tierlabor der Abteilung für Innere Medizin des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und unter sterilen Bedingungen gehalten. Das Alter der NOD-SCID Mäuse lag zu Beginn der Versuche zwischen vier und sechs Wochen.

2.2.2 Behandlungen

2.2.2.1 Ovariectomie

Die Nacktmäuse wurden ovariectomiert, um eine unkontrollierbare Beeinflussung des Hormonstatus der Tiere auf das implantierte Gewebe zu vermeiden.

Hierzu wurden die Mäuse mit Avertin (Sigma) narkotisiert, einer Lösung, die aus 10 ml tert.-Amylalkohol (Sigma) und 10 g 2,2,2 Tribromethanol (Aldrich) besteht. Diese Stammlösung wurde auf eine 2,5%ige Gebrauchslösung verdünnt und den Mäusen in der Dosierung von 0,014-0,018 ml/g Körpergewicht intraperitoneal appliziert.

Im Bereich des Rückens wurden die Mäuse mit 70 % Alkohol desinfiziert. Dorsal erfolgte in der Medianen ein etwa 1 cm langer Schnitt durch die Cutis und Subcutis. Die Muskulatur wurde jeweils in Höhe der Nieren stumpf von der Subcutis getrennt und circa 1 cm lateral der Wirbelsäule durchtrennt.

Die Ovarien wurden mittels einer Pinzette aus der Bauchhöhle vorgelagert und im Bereich der Eileiter mit Hilfe einer zweiten Pinzette von dem Uterushorn getrennt. Die vorgelagerten Uterusanteile wurden anschließend wieder in die Bauchhöhle reponiert. Die Subcutis und Cutis wurden mit Einzelheften eines resorbierbaren Fadens verschlossen.

2.2.2.2 Hormonsubstituierung

Die Hormonsubstituierung erfolgte durch die tägliche subkutane Injektion von 0,2 µg Östrogen (Sigma) in 400 µl Sesamöl.

2.2.2.3 Implantation von menschlichen Endometriumsfragmenten in Nacktmäuse

Die Nacktmäuse wurden narkotisiert (s. 2.2.2.1) und nach Erreichen des Toleranzstadiums der Narkose in eine stabile Rückenlage verbracht. Anschließend wurde die Cutis, Subcutis, Muskulatur sowie das Peritoneum etwa einen Finger breit kranial des Afters durchtrennt. Der Schnitt erfolgte in der Paramedianen und wies eine Länge von ungefähr 1,5 cm auf. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die Endometriumsfragmente vorsichtig mittels einer spitzen Pinzette auf die jeweiligen Organsysteme verbracht.

Nachfolgend wurde das Peritoneum und die Muskelschicht mit Hilfe von einfachen Hautheften verschlossen und die Maus in Seitenlage wieder in den Käfig gelegt.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach einem vorangegangenen Ätherrausch durch einen Genickbruch. Die anschließende Sektion der Tiere richtete sich nach dem offiziellen pathologischen Sektionsgang.

2.3 Lichtmikroskopie

2.3.1 Fixierung und Einbettung

Für die Auswertung des Probenmaterials wurden die Gewebefragmente für 24 Stunden in einer 4 %igen Paraformaldehydlösung fixiert und anschließend in den Paraffineinbettungsapparat (Citadell 1000 Shandon) gebracht.

Die Proben durchliefen dort das Programm mit folgenden Stationen:

- 70 % Alkohol (4 h)
- 70 % Alkohol (4 h)
- 80 % Alkohol (4 h)
- 90 % Alkohol (4 h)
- 96 % Alkohol (4 h)
- 96 % Alkohol (4 h)
- Isopropanol (8 h)
- Isopropanol (8 h)
- HistoClear (12 h)
- HistoClear (12 h)
- Paraffin (24 h)
- Paraffin (24 h)

2.3.2 Schnittechnik und histologische Färbungen

Von den in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mittels eines Mikrotoms (R. Jung AG, Heidelberg) Serienschnitte mit einer Dicke von 5 µm gefertigt und auf Objektträger montiert.

Für die Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung wurden die Schnitte zweimal je 10 Minuten in HistoClear entparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol, 96 % - 70 % Alkohol) geführt und 3 Minuten lang in destilliertem Wasser gespült. Dann wurden sie für 10 Minuten in einer Hämatoxylinlösung nach Shandon gefärbt, in Wasser gespült, kurz in HCl-Alkohol (s. 2.5) gebracht und schließlich 8 Minuten gewässert.

Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten in eine 1 %ige alkoholische Eosinlösung gebracht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, zweimal für je 5 Minuten in Histoclear überführt und mit Histomount (Shandon) eingedeckt.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Proliferationsmarker Ki67

Um die Proliferation der Epithel- und Stromazellen der Endometriumsfragmente zu untersuchen, wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers MIB1 (Dianova 505) das nukleäre zellproliferationsassoziierte Antigen Ki67 nachgewiesen, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Hierzu wurden die Paraffinschnitte deparaffiniert, für 15-20 Minuten in der Mikrowelle inkubiert und anschließend mit PBS (Phosphat Buffer Solution) gewaschen. Es wurden folgende Inkubationsschritte durchgeführt:

- Blockieren der Schnitte in H_2O_2
- 3 x 5 Minuten in PBS
- 20 Minuten mit Blocking Serum (Kaninchenserum) inkubiert
- 1 Stunde mit dem Primärantikörper MIB 1 (Dia 505, Dianova, Verdünnung 1:10 in PBS)
- 3 x 5 Minuten in PBS
- 30 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (B02, Dianova 315-065-003, Verdünnung 1:10 in PBS)
- 3 x 5 Minuten in PBS
- 30 Minuten mit dem Avidin-biotinylierten Peroxidase Komplex
- 3 x 5 Minuten in PBS
- 30 Sekunden in 1 % Triton X-100 in PBS
- DAB 3-7 Minuten
- 3 x in Aqua dest. gewaschen
- 5 Minuten Gegenfärbung mit Hämatoxylin
- 3 x in Aqua dest. gewaschen
- 2 x 5 Sekunden mit 5 % NH_4OH

- 2 x in 96 % Alkohol dehydriert
- 2 x in 100 % Alkohol dehydriert
- 10 Sekunden mit Xylol
- mit Mounting Medium eingedeckt

Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

2.4.2 Estrogen- und Progesteron-Rezeptor

Der immunhistochemische Nachweis des Estrogen- und Progesteronrezeptors wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Heß-Stumpp (Schering AA, Berlin) durchgeführt.

Dazu wurden die Schnitte entparaffiniert und einer Mikrowellenbehandlung unterzogen.

Nachfolgend wurden diese Inkubationsschritte durchgeführt:

- über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer wurden die Schnitte mit dem Estrogen Rezeptor (Bio Genex / Innovative Diagnostik Systeme: monoclonal Maus IgG Cat.: MU 272-UC / Puffer: Cat.: HK 164-5 K 1:50 mit Puffer verdünnt, dem Progesteron Rezeptor (Bio Genex / Innovative Diagnostik Systeme: super sensitive Maus anti P.R. (PR88) ist fertig zur Anwendung), und der Negativkontrolle (Bio Genex / Innovative Diagnostik Systeme: super sensitive Maus AK. HK 119-7M) inkubiert.
- 2 x 5 Minuten Waschen mit PBS
- 30 Minuten mit dem zweiten Antikörper (Bio Genex / Innovative Diagnostik Systeme: Multilink: super sensitive biotinylated Anti-Ig für Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte. Cat.: HK 340-5 K)
- 2 x 5 Minuten Waschen mit PBS
- 30 Minuten mit dem dritten Komplex (Bio Genex / Innovative Systeme: Label: Peroxidase konjugiertes Streptavidin Cat: HK 330 -5 K)
- 2 x 5 Minuten Waschen mit PBS
- die Anfärbung der Schnitte erfolgte mit DAB (Diaminobenzidin)
- 3 Minuten Spülen mit VE (voll entmineralisiertes) Wasser

- 7 Sekunden Gegenfärbung mit Hämalaun
- 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut
- durch eine aufsteigende Ethanolreihe geführt, einer Xylolbehandlung unterzogen und eingedeckt.

2.5 Zusammensetzung verwendeter Lösungen

Agarmedium

1g Agar wurde mit 25 ml destilliertem Wasser autoklaviert. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurden 25 ml steriles Kulturmedium (DMEM/ F12) zugegeben und jeweils 3-4 ml dieses Gemisches in eine Plastikpetrischale (Durchmesser 3,5 cm, Falcon) gegossen. Nach etwa 30 Minuten war das Agarmedium abgekühlt und erstarrt.

Tris-HCl-Puffer

Lösung A: 21,03 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan/ 1000 ml Aqua dest. (Tris 0,2 M)

Lösung B: 0,1 N HCl (Salzsäure)

Zur Herstellung des Puffers wurden 25 ml Lösung A mit 42 ml Lösung B gemischt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt, pH 7,4.

HCl-Alkohol (0,5 %)

Zur Herstellung wurden 20 ml 25 %ige Salzsäure (HCl) mit 980 ml 70 %igem Alkohol vermischt.

2.5.1 Auflistung der Chemikalien und Kulturmedien

Chemikalien

Agar (Merck, Darmstadt)

t-Amyl-Alkohol (Sigma A1685)

Diethylether (Mallinckodt Baker 1155)

Diaminobenzidin (DAB) (ICN Biomedicals 98-068, Ohio)
Eosin (Merck, Darmstadt)
Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
Histomount (Shandon 9999122)
17- β -Östradiol (Sigma E 2758)
Paraplast (Sherwood 1000996)
PBS Dulbecco ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom L 182-50)
Penicillin-Streptavidin (50 000 U Pen, 50 mg Strep; Böhringer, Mannheim 1074440)
Sesamöl (Oleum sesami, H. Lamotte G 182, Bremen)
2,2,2-Tribromethanol (Aldrich, T4, 840-2)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30%) (Merck, Darmstadt)

Kulturmedien

FCS (Fetal Calf Serum) (Biochrom)
Ham'F-12 (Flow Laboratories)
DMEM (Dulbecco's Mod Eagle Medium) (Gibco 41966-021)

3. ERGEBNISSE

3.1 Lokalisation und Morphologie der Endometriumsfragmente

3.1.1 Lokalisation der Fragmente im Bauchraum von zyklischen Nacktmäusen

Wie unter 2.2.2.3 beschrieben wurden die menschlichen Endometriumsfragmente in den Bauchraum von Nacktmäusen implantiert. Sie wurden gezielt auf den Darm, die seitliche Bauchwand und den Uterus plaziert und in der Bauchhöhle in Zeitintervallen von 2, 4, 12, 14 und 21 Tagen kultiviert. Nach diesen Zeitintervallen wurde der Bauchraum der Mäuse eröffnet, die Endometriumsfragmente lokalisiert (Abb.1a), herausgeschnitten und morphologisch aufgearbeitet. Der Prozentsatz der wiedergefundenen Implantate lag in dem Zeitraum zwischen dem 4.-21. Tag nach der Operation nahezu konstant bei 33 %. Die vorrangige Lokalisation der angewachsenen Fragmente nach der Kultur in den Tieren war auf dem Darm (26,6 %, Abb.1a), der seitlichen Bauchwand (32 %, Abb.1d, f) und in dem Fettgewebe (18 %, Abb.1b, c).

Zwei Tage nach Operation wurden allerdings nur 10 % der implantierten Fragmente wiedergefunden, so daß dieser Zeitraum möglicherweise zu kurz ist, um ein erfolgreiches Anwachsen und damit Auffinden der Implantate zu ermöglichen.

Generell zeigten die implantierten Endometriumsfragmente auch nach einer längeren Kulturdauer in der Nacktmaus eine gut erhaltene Morphologie.

Nach 4 Tagen zeigten sich in den Läsionen noch deutlich englumige Drüsen mit hochprismatischem Epithel, umgeben von zellreichem Stroma (Abb.1d).

Ab einer Kulturdauer von 14 Tagen wiesen die Endometriumsfragmente eine heterogene Morphologie auf. In einigen Fragmenten waren weitlumige Drüsen zu beobachten, die in großen Bereichen ein stark abgeflachtes Epithel aufwiesen (Abb.1g), während die Drüsen in den anderen Fragmenten auch nach 14 Tagen englumig waren und ein hochprismatisches Epithel zeigten.

Auffallend war der große Anteil an Stromagewebe in den Fragmenten. Insbesondere am 21.Tag war ein infiltratives Wachstum des stromalen Anteils des Endometriums in die Muskulatur der seitlichen Bauchwand zu beobachten (Abb.1h).

Zudem war in einem Teil der Implantate eine deutliche Lymphozyteninvasion zu erkennen (Abb.1e, f, h).

3.1.2 Transplantation in zyklische NOD-SCID-Mäuse

Die Besonderheit der NOD-SCID-Mäuse liegt darin, daß sie weder T- noch B-Lymphozyten ausbilden und zudem die Aktivität der “Natural-Killer“-Zellen gestört ist. Hier sollte getestet werden, ob das im Vergleich zu den Nacktmäusen stärker reduzierte Immunsystem der Mäuse zu einer besseren Erhaltung der implantierten Endometriumsfragmente führt. Um die sehr infektionanfälligen Tiere nicht zu stark zu belasten, wurden die Versuche zunächst nur an zyklischen und nicht ovariectomierten NOD-SCID Mäusen durchgeführt.

Der Prozentsatz der wiedergefundenen Endometriumsfragmente unterschied sich nicht signifikant von denen aus den oben beschriebenen Experimenten, und die genau wie bei den zyklischen Nacktmäusen eine gut erhaltene morphologische Struktur mit zellreichem Stroma und Drüsen mit hochprismatischem Epithel zeigten (Abb. 2a, b). Der geringe Prozentsatz von 8,3 % der Implantationsrate an Tag 21 (Tabelle 1) erklärte sich dadurch, daß während der Sektion bei den Tieren eine mittelgradige Peritonitis festgestellt wurde.

Im Hinblick auf die Morphologie der Endometriumsfragmente zeigte sich vor allem nach längerer Kulturdauer eine bessere Erhaltung der endometrischen Läsionen. Die ektopischen Endometriumsfragmente wiesen auch nach 28 Tagen gut erhaltene Drüsen mit einem hochprismatischen Epithel und ein zellreiches Stroma auf (Abb. 2c, d). Alle Fragmente waren morphologisch gut erhalten.

3.1.3 Transplantation in ovariectomierte Nacktmäuse mit und ohne Östrogen-substitution

In dieser Versuchsreihe sollte der Entzug von Hormonen und die alleinige Wirkung von Östrogen auf das ektopische Endometrium analysiert werden. Dazu wurden die Mäuse zunächst ovariectomiert, um die endogene Steroidhormonproduktion weitgehend auszuschalten. Nach der Transplantation der Gewebefragmente in die Bauchhöhle wurde eine experimentelle Gruppe mit Östrogen substituiert, die andere nur mit der

Trägersubstanz. Zudem sollte der Einfluß einer 24-stündigen in-vitro-Vorkultur auf den Erhalt der Endometriumsfragmente im Nacktmausmodell ausgetestet werden.

Die Endometriumsfragmente wurden, wie unter 3.1.1 beschrieben, intraperitoneal auf verschiedene Organe implantiert. Die Mäuse wurden vom ersten Versuchstag an entweder mit 17- β -Östrogen oder nur mit der Vehikelsubstanz (Sesamöl) für die Dauer des Implantationsintervalls (3-21 Tage) substituiert.

Die Anzahl der wiedergefundenen Fragmente unterschied sich nicht signifikant von denen, die in den zyklischen Tiere wiedergefunden wurden (Tabelle 1). Auch hier war die Hauptlokalisation der Endometriumsfragmente auf dem Darm (11,5 %) und an der Muskulatur der Bauchwand (73 %) (Abb. 3a, d). In beiden Versuchsreihen war das implantierte Gewebe bis zum 14. Tag morphologisch gut erhalten.

Ein signifikanter morphologischer Unterschied zwischen östrogenbehandelten und unbehandelten Tieren konnte nicht beobachtet werden.

Nach 21 Tagen waren die Fragmente noch morphologisch gut erhalten und wiesen allerdings ein flaches, plattenepithelartiges Drüsenepithel auf (Abb. 3 d).

Auch hier war eine deutliche Lymphozyteninfiltration in das ektopische Endometrium zu beobachten (Abb. 3b). Die Verteilung der wiedergefundenen Fragmente auf den Organen war ähnlich wie bei den zyklischen Tieren, sie befanden sich an der Bauchmuskulatur und auf dem Darm.

3.1.3.1 Vorkultur der Endometriumsfragmente

In dieser Versuchsreihe wurde das Endometrium nach der Entnahme zunächst für 24 Stunden in vitro in mit Agar beschichteten Petrischalen vorkultiviert. Es sollte getestet werden, ob durch diese Vorkultur die beobachtete Infiltration des Implantates mit Lymphozyten reduziert werden konnte. Anschließend wurden die Fragmente entsprechend in die Bauchhöhle von ovariectomierten Nacktmäusen implantiert und die Tiere mit bzw. ohne Östrogensubstitution bis zu 13 Tagen gehalten. Die Wiederfindungsrate war in dieser Versuchsreihe sehr heterogen, insgesamt war sie sowohl mit als auch ohne Hormongabe schlechter als in den Versuchsreihen mit frischem, nicht vorkultiviertem Endometrium (Tabelle 1). Zudem konnte gezeigt werden, daß die vorkultivierten Endo-

metriumsfragmente nach der Kultur in der Nacktmaus Nekrosen (3e) und ein in sich stärker aufgelockertes Endometriums Gewebe (3e, f) mit nicht mehr gut definierten Drüsenstrukturen und degenerierendem Epithel aufwiesen als die nicht vorkultivierten Fragmente.

3.2 Proliferation der Endometriumsfragmente nach Kultur in Nackt- und NOD-SCID Mäusen

Die Proliferationsrate von den Drüsenepithelzellen wurde in den endometrialen Läsionen festgestellt, die in den zyklischen Mäusen und in den ovariectomierten Tieren, die wiederum entweder mit Östrogen oder mit der Vehikelsubstanz (Sesamöl) behandelt wurden, gewachsen sind. Es wurde der Proliferationsindikator Ki-67 verwandt und die markierten Zellen ausgezählt. Als Ausgangsgewebe diente Endometrium der Proliferationsphase, das eine deutliche Färbung für Ki-67 zeigte. (Abb. 4a)

Für jeden experimentellen Versuchsansatz wurden die proliferierenden Drüsenzellen von drei Endometriumsfragmenten analysiert. Die höchste Proliferationsrate wurde in den Läsionen festgestellt, die in den unbehandelten, zyklischen Mäusen angewachsen sind. Eine Proliferationsrate von 77 % konnte in den Drüsenepithelzellen auch noch nach einer Kulturdauer von 21 Tagen in der Nacktmaus beobachtet werden, bei den NOD-SCID Mäusen wurde eine Proliferationsrate von 37,5 % entdeckt. In den ovariectomierten Mäusen war die Proliferation bei den Tieren erhöht, die mit Östrogen behandelt worden sind (36,9 %) (Abb. 4b, c), verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren (7,7 %) nach 21-tägiger Kulturdauer (Tabelle 2).

3.3 Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in den Endometriumsfragmenten nach Kultur in Nackt- und NOD-SCID Mäusen

In den endometrialen Läsionen von zyklischen Nacktmäusen und ovariectomierten Tieren wurde die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht. Generell wurden Östrogenrezeptoren sowohl von dem Drüsenepithel als auch von den

Stromazellen exprimiert. Die Drüsenepithelzellen der endometrialen Läsionen von Nacktmäusen und NOD-SCID Mäusen wiesen bis zum 14.-28. Tag Progesteronrezeptoren auf (Abb. 5a, b, c, d).

Bei den nicht vorkultivierten Endometriumsfragmenten in den ovariectomierten, mit und ohne Östrogen behandelten Tieren, wurden keine Östrogen- und Progesteronrezeptoren ab dem 3. Tag bis zum 21. Tag nachgewiesen (Tabelle 3).

Währenddessen konnte eine schwache Markierung der Östrogenrezeptoren in den Endometriumsfragmenten an der Bauchwand der östrogenbehandelten, ovariectomierten Tiere am 21. Tag beobachtet werden (Abb. 5e).

Nach der 24-stündigen Vorkultivierung der Fragmente konnten ab dem 6. Tag sowohl bei den mit Östrogen behandelten als auch bei den ohne Östrogen behandelten, ovariectomierten Nacktmäusen keine Östrogen- und Progesteronrezeptoren diagnostiziert werden (Tabelle 3).

3.4 Invasion der endometrialen Fragmente in das Wirtsgewebe und Angiogenese der Fragmente

Eine Einsprossung von Blutgefäßen der Maus in die endometrischen Läsionen tritt erst ab dem 4. Tag nach der Implantation der Endometriumsfragmente auf, die an der Leber, dem Fettgewebe und dem Darm angeheftet sind. Nach 7 Tagen Implantationsdauer konnten zahlreiche Gefäße, über das gesamte Endometriumsfragment verteilt, festgestellt werden, unabhängig von der Lokalisation (Abb. 6a, b).

Das Einsprossen der Wirtsgefäße aus der Tunica muscularis des Darmes der Maus in das humane Endometriumsfragment war zu beobachten (Abb. 6c). Es konnte allerdings keine Korrelation zwischen dem zeitlichen Auftreten der Neoangiogenese, der Anzahl der neu gebildeten Gefäße und der Lokalisation der Endometriumsfragmente auf dem Peritoneum festgestellt werden.

Eine Invasion von endometrialen stromalen Zellen in das Wirtsgewebe konnte insbesondere an der Muskulatur der Bauchwand (Abb. 3e, 7c, d), der Tunica muscularis des Darmes (Abb. 7b) und am mesenterialen Fettgewebe (Abb. 7a) festgestellt werden. Die Invasion der endometrialen Zellen in die Leber war jedoch deutlich geringer (Abb. 3b).

Es war auffällig, daß die oben aufgeführte Lokalisationsreihenfolge des Invasionsphänomens durch alle Versuche beibehalten wurde. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Invasionsausmaß und den einzelnen Versuchsansätzen konnte allerdings nicht beobachtet werden.

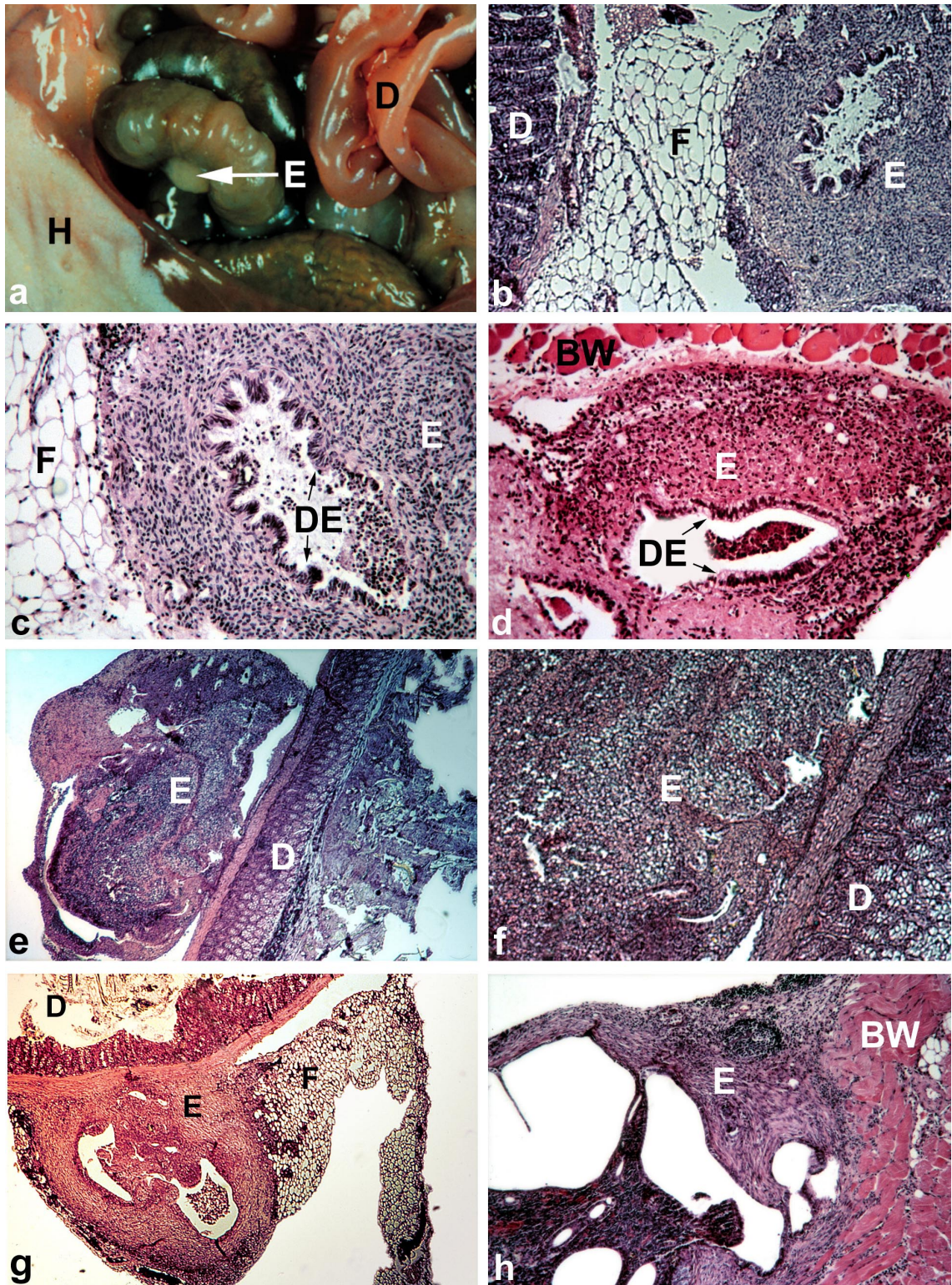


Abb. 1 (Beschreibung nächste Seite)

Abb. 1: Morphologie der Endometriumsfragmente zu verschiedenen Zeiten nach Implantation in zyklische Nacktmäuse

- a) Magen-Darm-Trakt einer seziierten Maus mit angewachsenem Endometriumsfragment (E, Pfeil) am Dickdarm (D). (4x) (H = Haut der Maus)
- b) Endometriumsfragment (E) adhäriert an das mesenteriale Fettgewebe (F), das den Darm (D) umgibt, 2 Tage nach Transplantation. (50x)
- c) Ausschnitt aus 1b). Das Endometriumsfragment (E) zeigt eine gute Erhaltung der Morphologie, die endometrialen Drüsen weisen ein hochprismatisches Epithel auf. (60x)
- d) Endometriumsfragment (E), adhäriert an der Muskulatur der Bauchwand (BW) mit hochprismatischem Drüsenepithel (DE) und zellreichem Stroma nach 4 Tagen Kultur. (60x)
- e) Endometriales Gewebe (E), an der Tunica muscularis des Darms (D) adhäriert, 4 Tage nach Implantation. (30x)
- f) Vergrößerung des Adhäsionsbereiches aus e). (50x)
- g) Endometriumsfragment (E), fest verwachsen zum einen mit der Tunica muscularis des Darmes (D), zum anderen mit dem mesenterialen Fettgewebe (F) nach 14 Tagen Kultur. (22x)
- h) Endometriumsfragment (E), adhäriert an die Bauchwand (BW).
21 Tage nach Implantation weisen die endometrialen Drüsen ein weites Lumen und ein abgeflachtes Drüsenepithel auf. (40x)

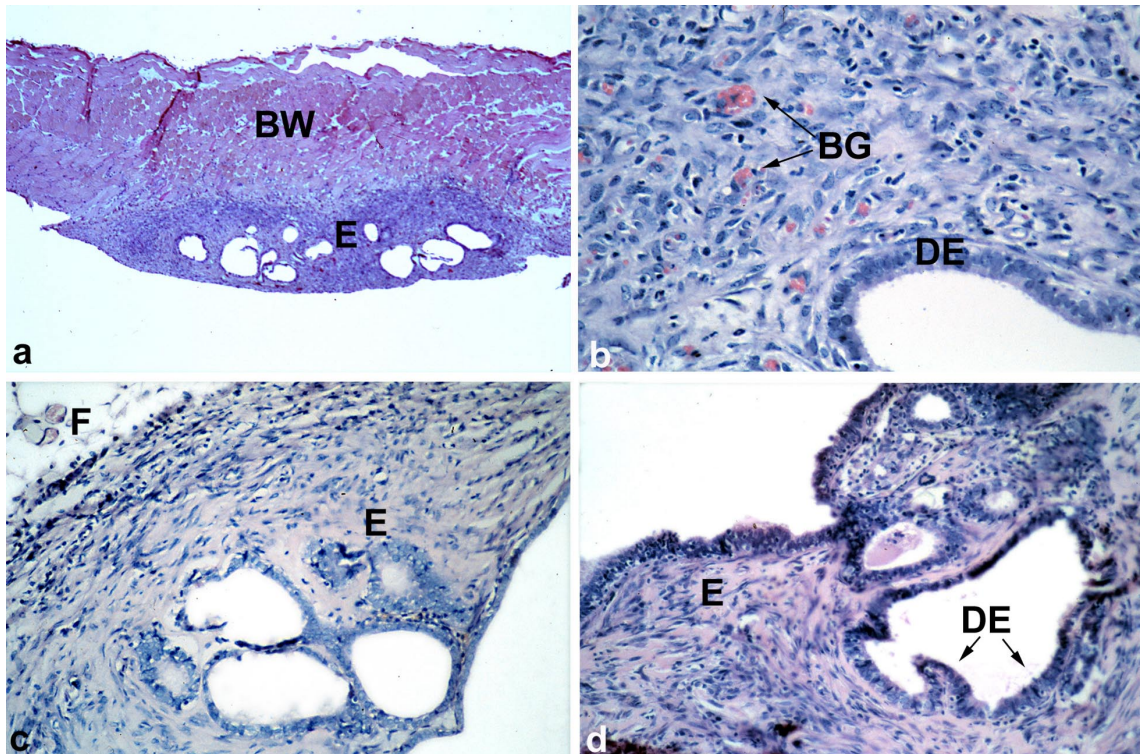


Abb. 2: Morphologie der Endometriumsfragmente zu verschiedenen Zeiten nach Implantation in zyklische NOD-SCID-Mäuse

- a) Endometriumsfragment (E) angewachsen an die Muskulatur der Bauchwand nach 9 Tagen. (15x)
- b) Ausschnitt aus dem Endometriumsfragment a) mit gut erhaltener Drüse mit hochprismatischem Epithel (DE) und Blutgefäßen (BG) im endometrialen Stroma. (300x)
- c) Endometriumsfragment (E), adhäriert an das mesenteriale Fettgewebe (F), zeigt auch 28 Tage nach Implantation in die NOD-SCID Maus gut erhaltene Drüsen. (60x)
- d) Ausschnitt aus einem Endometriumsfragment (E), das auch nach 28 Tagen Kultur in der NOD-SCID Maus ein hochprismatisches Drüsene epithel (DE) aufweist. (50x)

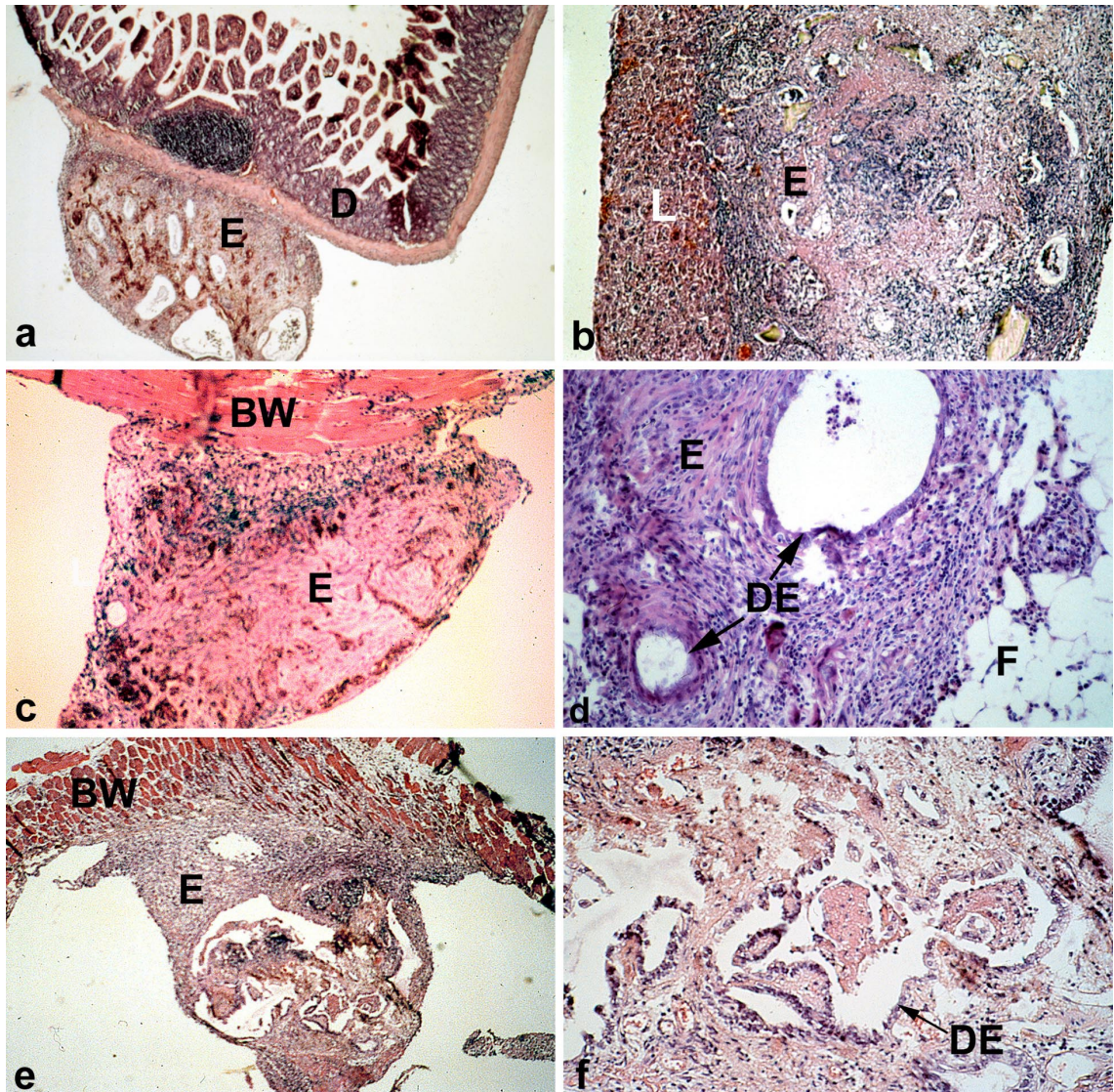


Abb. 3: Morphologie der Endometriumsfragmente zu verschiedenen Zeiten nach Implantation in mit 17- β -Östradiol (E2) behandelte (a-d) sowie unbehandelte (e-f) ovariectomierte Nacktmäuse

- a) Nach 7 Tagen Kultur in der Nacktmaus zeigt sich eine gut erhaltene Morphologie der Endometriumsfragmente (E), angeheftet an die Tunica muscularis des Darms (D) (15x), sowie
- b) an die Leber (L) (40x) und
- c) nach 8 Tagen an die Muskulatur der Bauchwand (BW) (50x).
- d) 21 Tage nach Implantation zeigen die Endometriumsfragmente erweiterte Drüsen mit abgeflachtem Drüseneithel (DE). (50x) (F = Fettgewebe)
- e) Endometriumsfragment (E), angeheftet an die Muskulatur der Bauchwand

(BW) 5 Tage nach Implantation in die Nacktmaus. (15x)

- f) Dieser Ausschnitt aus e) zeigt die schlechte Erhaltung der endometrialen Drüsenmorphologie in den unbehandelten ovariectomierten Mäusen. (60x)
(DE = Drüsenepithel)

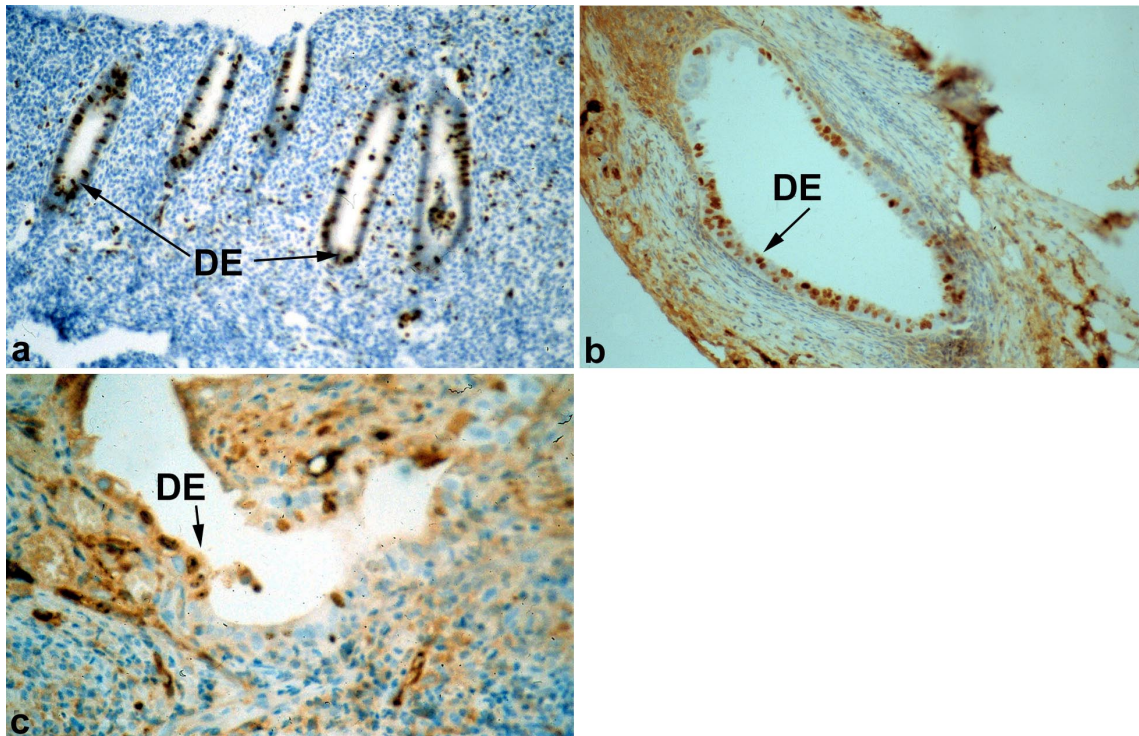


Abb. 4: Immunhistochemische Markierung proliferierender Zellen in den Drüsenepithelien von in mit E_2 behandelten, ovariectomierten Nacktmäusen kultivierten Endometriumsfragmenten

- a) Vor der Implantation zeigt aus einer Küretage gewonnenes Ausgangsmaterial der Proliferationsphase eine starke Proliferationsaktivität der Drüsenepithelzellen (DE). (100x)
- b) Nach 7 Tagen Kultur in der Nacktmaus zeigt sich noch eine starke Proliferation der Drüsenepithelzellen (DE) (120x), während
- c) nach 13 Tagen Kultur in Endometriumsfragmenten, die zuvor über Nacht in vitro kultiviert wurden, kaum noch proliferierende Zellen im Drüsenepithel zu detektieren sind. (150x)

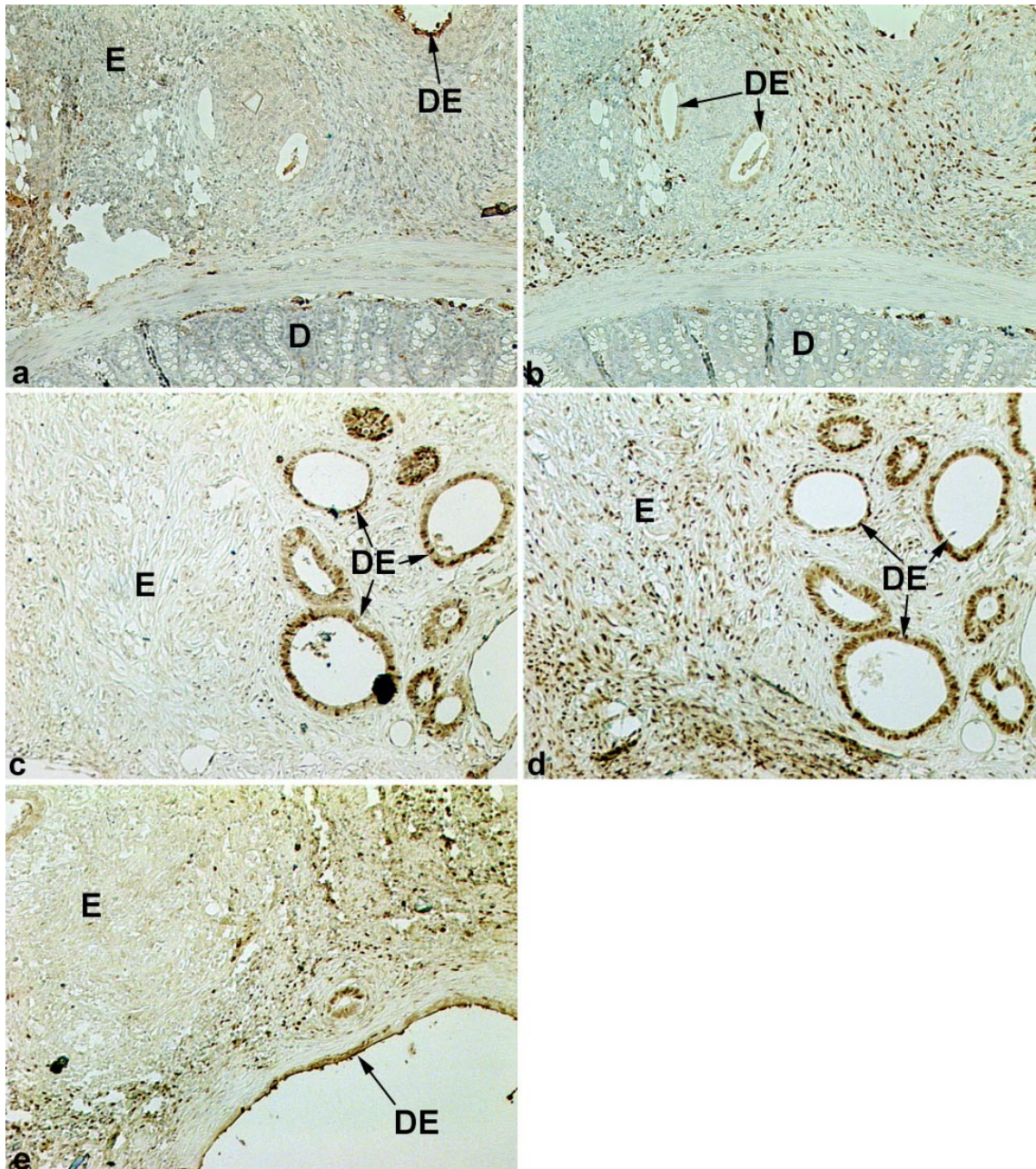


Abb. 5: Immunhistochemische Markierung von Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptoren (PR) in humanen Endometriumsfragmenten

- a) Expression von PR in den Drüsenepithelzellen eines Endometriumsfragments (E) am Darm (D) der zyklischen Nacktmaus nach 14 Tagen. (50x)
- b) Expression von ER in den Stromazellen eines Endometriumsfragments am Darm (D) nach 14 Tagen in der zyklischen Nacktmaus. (60x)
(DE = Drüsenepithel)
- c) Expression von PR in den Drüsenepithelzellen (DE) eines Endometrium-

fragments (E) in der NOD-SCID MAUS nach 28 Tagen. (50x)

- d) Expression von ER in den Drüsenepithel- und Stromazellen eines Endometriumsfragments (E) nach 28 Tagen in der NOD-SCID Maus. (50x)
- e) Expression von ER in den Drüsenepithel- und Stromazellen eines Endometriumsfragments (E) an der Muskulatur der Bauchwand (BW) einer ovariectomierten, mit E₂ behandelten Nacktmaus nach 21 Tagen. (50x)

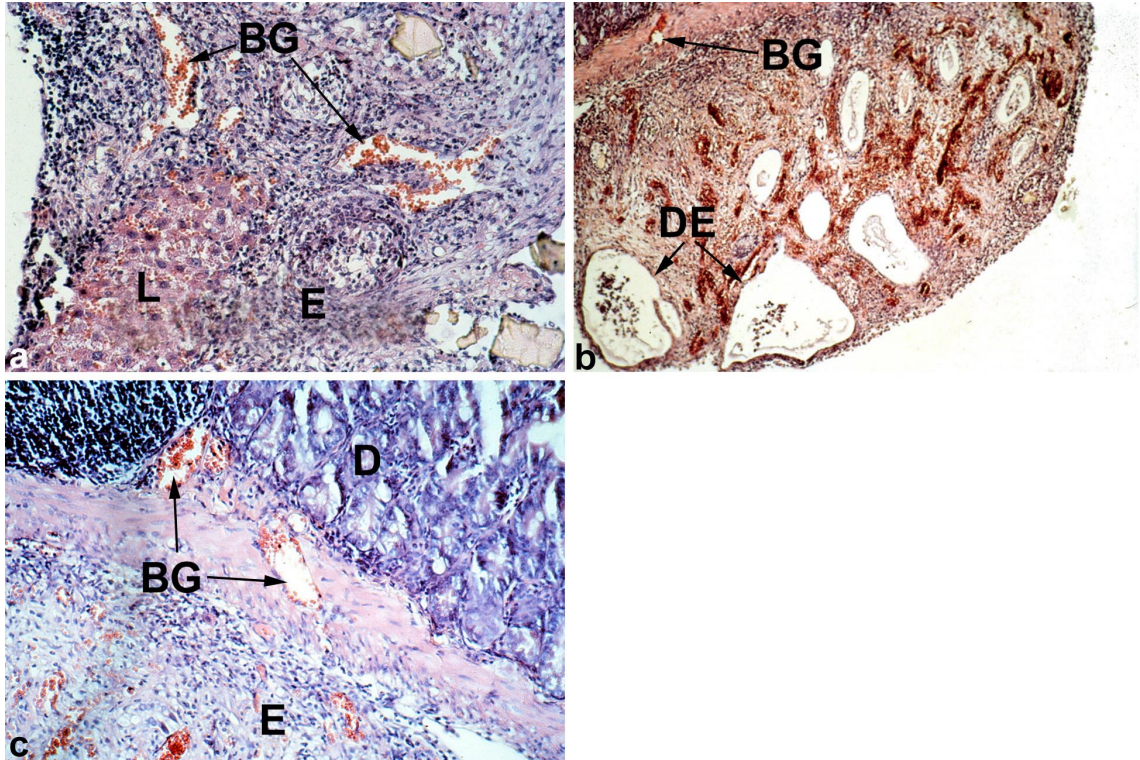


Abb. 6: Angiogenese in Endometriumsfragmenten nach 7 Tagen Kultur in mit E₂ behandelten, ovariectomierten Nacktmäusen

- a) Adhäsionsstelle von Endometrium und Lebergewebe, beginnende Angiogenese. (60x)
- b) Endometriumsfragment adhäriert am Darm, Drüsenstruktur mit abgeflachtem Epithel und Blutgefäßen (BG). (30x)
- c) Ausschnitt aus b). Beginnende Angiogenese vom Darm ins Endometrium. (60x)
(BG = Blutgefäß, DE = Drüsenepithel, E = Endometriumsfragment, D = Darm, L = Leber)

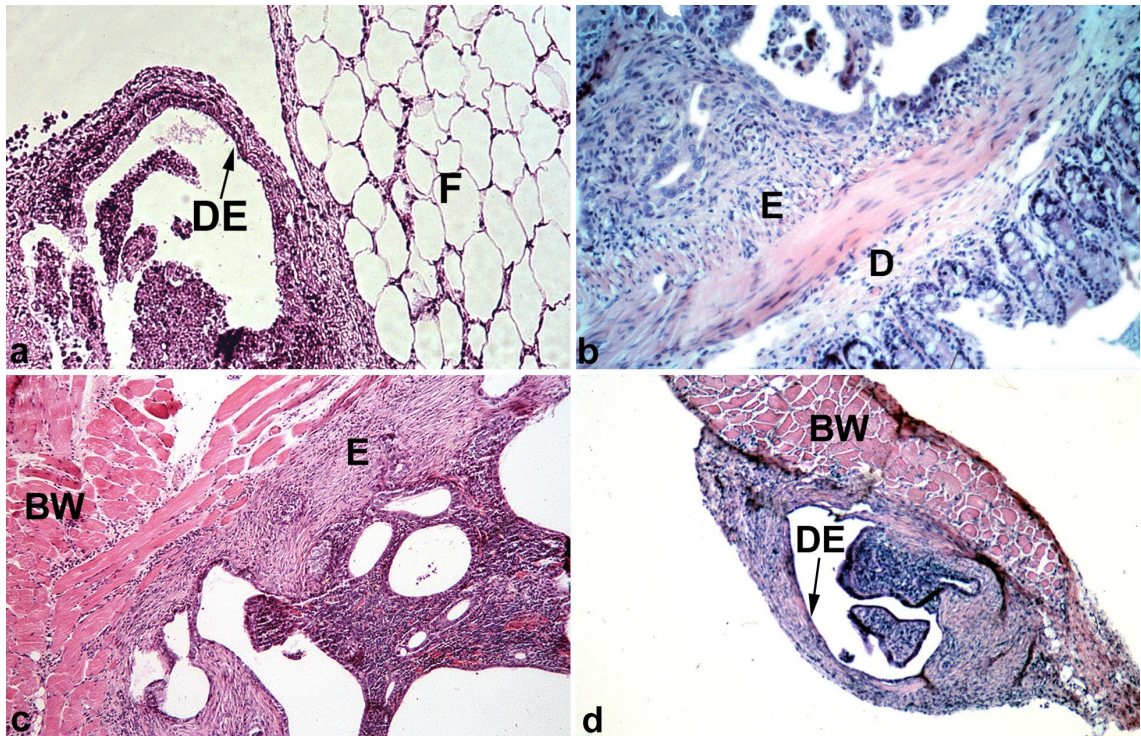


Abb. 7: Invasionsverhalten von humanem Endometriumsgewebe in das Wirtsgewebe nach Implantation in die Nacktmaus bzw. in die NOD-SCID Maus

- a) Invasion eines in vitro kultivierten, endometrialen Gewebefragments in das mesenteriale Fettgewebe (F) des Darms einer ovariectomierten, mit E_2 behandelten Nacktmaus nach 5 Tagen. (60x) (DE = Drüsenepithel)
- b) Invasion von endometrialen Zellen (E) in die Tunica muscularis des Darms nach 9 Tagen in der NOD-SCID Maus. (50x)
- c) Invasion von endometrialen Zellen in die Muskulatur der Bauchwand (BW) nach 12 Tagen in der zyklischen Nacktmaus. (40x)
- d) Invasion von endometrialen Zellen in die Muskulatur der Bauchwand nach 21 Tagen in der zyklischen Nacktmaus. (15x)

Tabelle 1: Wiederfindungsrate der endometrialen Läsionen

	d	n	I	S	%
Zyklische Tiere	2	3	10	1	10
	4	2	9	3	33,3
	12	1	3	1	33,3
	14	3	17	7	41,2
	21	4	12	4	33,3
Ovx /-Vorkultur -E ₂ +E ₂	3	1	4	2	50
	7	1	3	0	0
	9	1	5	4	80
	14	2	8	6	75
	21	3	9	1	11,1
	3	1	3	1	33,3
	7	1	5	4	80
	9	1	4	3	75
	14	3	6	3	50
	21	2	6	3	50
Ovx /+Vorkultur -E ₂ +E ₂	4	1	3	0	0
	5	3	12	6	50
	6	2	6	2	33,3
	8	1	3	0	0
	10	2	8	1	12,5
	13	1	3	0	0
	4	1	3	0	0
	5	3	9	2	22,2
	6	2	6	0	0
	8	1	5	3	60
	10	2	8	0	33,3
	13	1	3	1	
NOD-SCID Maus	9	2	8	2	25
	14	2	10	4	40
	21	3	12	1	8,3
	28	2	8	3	37,5

(Legende zur Tabelle siehe S.30)

Tabelle 2: Proliferationsrate der Epithelien in den endometrialen Läsionen

	d	MIB (%)
Zyklische Tiere	4	8,4
	14	2,7
	21	85
	21	49,2
	21	97,1
Ovx /-Vorkultur		
	-E ₂	
	3	0
	9	21,9
	21	7,7
	+E ₂	
	3	12,7
	7	10,9
	21	36,9
Ovx /+Vorkultur		
	-E ₂	
	5	0,32
	6	72,0
	10	7,1
	+E ₂	
	3	5,5
	13	44,7
NOD-SCID Maus		
	9	23,5
	28	0,5
	28	33,3
	28	23,6

(Legende zur Tabelle siehe S.30)

Tabelle 3: Immunhistochemischer Nachweis von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren (ER /PR)

	d	ER	PR
Zyklische Tiere	4	+	+
	14	+	+
	21	-	-
	21	-	-
	21	-	-
Ovx /-Vorkultur -E ₂	3	-	-
	9	-	-
	21	-	-
	3	-	-
	7	-	-
	21	+	-
Ovx /+Vorkultur -E ₂	5	+	n.a.
	6	-	-
	10	-	-
	3	-	-
	13	-	-
NOD-SCID Maus	9	+	-
	28	+	+
	28	++	-
	28	+	+

Legende zu den Tabellen:

d: Implantationsintervall in Tagen

I: Implantationsrate

%: Wiederfindungsrate in %

MIB (%): Proliferationsrate in %

PR: Progesteronrezeptor

n.a.: nicht auswertbar

n: Anzahl der Tiere

S: Wiederfindungsrate

Ovx: ovariectomized Tiere

ER: Estrogenrezeptor

E₂: 17-β-Östrogen

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, in dem neue Therapieansätze zur Behandlung der Endometriose getestet werden können. Hierzu wurden Fragmente von humanem Endometrium in die Bauchhöhle von Nackt- und NOD-SCID Mäusen implantiert. Die Untersuchung umfaßte eine Kulturdauer von einem Zeitraum von 2 Tagen bis zu 4 Wochen.

4.1 Lokalisation und Anheftungsrate der Endometriumsfragmente

In allen Versuchsreihen wurden die Endometriumsfragmente gezielt an die Bauchwand, auf den Darm, die Harnblase und den Uterus plziert, dennoch wurden die Fragmente bei der Sektion auch an anderen Stellen wiedergefunden, nie jedoch auf der Harnblase und dem Uterus, sondern allenfalls auf dem den Urogenitaltrakt umgebenden Fettgewebe.

Die meisten Endometriumsfragmente hatten sich im Bereich der Bauchwand implantiert. Die nächsthäufigsten Anheftungsstellen waren der Darm und das Fettgewebe, das den gesamten Magen-Darm-Trakt umgibt. Diese Reihenfolge war durch die gesamten Versuchsreihen hindurch zu beobachten.

Durch die fehlende Fixation der Fragmente und die Darmmotorik der Tiere wurden die Fragmente aus ihrer ursprünglichen Lokalisation verschoben und teilweise zwischen den Darmschlingen eingeschlossen, wodurch vermutlich die hohe Anzahl an implantierten Fragmenten im Bereich des Darmes resultiert.

Auch Tabibzadeh et al. (1999) beobachteten nach intraperitonealen Injektionen von Endometriumsfragmenten endometriotische Herde vornehmlich an der Sklettmuskulatur und an dem Fettgewebe, das die Bauchorgane umgibt.

Die vermehrte Anlagerung an der Bauchwand könnte dadurch erklärt werden, daß vor allem im Bereich der Nahtstelle eine lokale Reizung des Peritoneums vorlag, so daß sich die Gewebefragmente hier bevorzugt anhefteten.

Tabibzadeh et al. (1999) konnten bereits zeigen, daß eine lokale Reizung des Peritoneums die Anheftung von Endometriumsfragmenten an diesen Stellen fördert.

Van der Linden et al. (1996) gingen davon aus, daß die Implantation von Endometriumsfragmenten nur durch eine Verletzung des Mesothels zustande kommen kann. Diese Hypothese wurde durch Nisolle et al. (2000) widerlegt, die zeigen konnten, daß sich endometriales Gewebe auch in Bereichen mit intaktem Peritoneum anheften und implantieren kann. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß sich die Tiere nach dem operativen Eingriff frei bewegen konnten, so daß der tiefste Punkt des Peritoneums im Bereich der Bauchwand lag. Diese Wirkung der Schwerkraft könnte auch die Anheftung im Bereich der Leber erklären, eine Lokalisation, die man beim Menschen nicht findet.

Im Gegensatz hierzu befinden sich beim Menschen die meisten Endometrioseherde im Bereich des Douglas-Raumes, der hier den tiefsten Punkt der Peritonealhöhle darstellt.

Die im Vergleich zu späteren Zeitpunkten generell sehr geringe Wiederfindungsrate nach 2 Tagen könnte dadurch erklärt werden, daß dieser Zeitraum möglicherweise zu kurz für eine stabile Anheftung der Fragmente an das darunterliegende Gewebe ist, so daß diese noch frei im Bauchraum flottieren und daher schlecht lokalisiert werden konnten. Ein Zeitraum von 4 Tagen reicht dagegen für eine Anheftung des Endometriumsgebietes offensichtlich aus.

Die Anheftungsrate war jedoch deutlich reduziert, wenn die Endometriumsfragmente vor der Transplantation zunächst für 24 Stunden *in vitro* kultiviert wurden. Dies beruht wahrscheinlich auf einer geringeren Adhäsivität der Fragmente, die durch eine teilweise Regeneration der Epitheldecke bzw. durch eine Glättung der Fragmentoberfläche durch die Anordnung der Stromazellen bedingt sein könnte. Eine vollständige Regeneration der Epithelbedeckungen von humanen Endometriumsfragmenten in der Organkultur konnte von Grümmer et al. (1994) nach drei Tagen Kulturdauer nachgewiesen werden.

Die generell relativ geringe Rate an implantierten Fragmenten könnte an der in den Nacktmäusen noch vorhandenen Immunantwort der B-Lymphozyten liegen. Zusätzlich zu den B-Lymphozyten sind bei diesen Tieren die Natural-Killer (NK)-Zellen aktiv.

Die NK-Zellen beteiligen sich als extrazellulärer Tötungsmechanismus ebenfalls am Immunsystem. Es handelt sich bei ihnen um lymphozytenähnliche Zellen, die Zellmarker exprimieren, die wiederum auf T-Lymphozyten und zum Teil auch auf Granulo-

zyten vorhanden sind. Eine Möglichkeit zur Suppression dieser Immunantwort ist die Verwendung von anti-Asialo Antikörpern (Aoki et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde ein anderer Ansatz gewählt, das heißt die Verwendung von NOD-SCID Mäusen. Durch die Verwendung von NOD-SCID Mäusen wird der immunologischen Reaktion der Tiere auf die Transplantate vorgebeugt, da diese Tiere ein angeborenes Defizit an T- und B-Lymphozyten haben und als erfolgreiche Wirtstiere für verschiedene Heterotransplantate beschrieben wurden (Philipps et al. 1989). Die Anheftungsrate der Endometriumsfragmente war in den NOD-SCID Mäusen im Vergleich zu den Nacktmäusen jedoch nicht erhöht, so daß die durchschnittliche Verlustrate an Endometriumsfragmenten von circa 66 % nicht durch das Vorhandensein der NK-Zellen erklärt werden kann.

4.2 Morphologie der ektopischen Endometrien

Generell zeigte sich eine sehr gute Erhaltung der Gewebefragmente sowohl in den Nacktmäusen als auch in den NOD-SCID Mäusen.

Bis zu einer Kulturdauer von 14 Tagen waren englumige Drüsen zu beobachten, deren Epithel unterschiedlich hoch war. Diese unterschiedliche Epithelstruktur kommt möglicherweise dadurch zustande, daß die Endometriumsfragmente von unterschiedlichen Patientinnen stammen, die sich entweder in der beginnenden oder abklingenden Proliferationsphase befanden. Ab dem 14. Tag traten vor allem bei den Nacktmäusen weitlumige Drüsen mit abgeflachtem Epithel auf.

Diese weitlumige Form der Drüsen beobachteten auch Aoki et al. (1994) nach einem Transplantationszeitraum von 14 Tagen. Die aufgeblähte Drüsenstruktur scheint dadurch entstanden zu sein, daß die Drüsenepithelzellen auch während der Kultur in der Nacktmaus weiterhin sekretorisch aktiv sind, und der Sekretabfluß nach einer längeren Implantationsdauer jedoch gestört ist. Solche dilatierten Drüsenstrukturen waren bei den in den NOD-SCID Mäusen kultivierten Endometrien jedoch auch nach einer Kulturdauer von bis zu 28 Tagen nur sehr selten zu beobachten.

Generell war das implantierte humane Endometriumsgewebe auch nach einer Kulturdauer von 28 Tagen in den NOD-SCID Mäusen in seiner Struktur sehr gut erhalten.

Bei den in den Nacktmäusen kultivierten Endometriumsfragmenten konnte eine Infiltration von Lymphozyten in die endometriotischen Läsionen beobachtet werden.

Eine solche Lymphozyteninfiltration, die auch in normalem humanen Endometrium vorkommt, wurde auch von Tabibzadeh et al. (1999) in endometriotischen Läsionen in der Nacktmaus beschrieben.

Um diese Immunreaktion zu reduzieren, wurde humanes Endometriums-gewebe zunächst für 24 Stunden in vitro kultiviert, bevor es in die Nacktmäuse transplantiert wurde. Die vorkultivierten Fragmente zeigten jedoch nach der Kultur in der Nacktmaus generell eine schlechtere Morphologie als die frisch implantierten Gewebe, und es konnte durch die Vorkultur keine Reduktion der Lymphozyteninfiltration in das endometriale Gewebe erzielt werden. Eine Vorkultivierung der Endometriumsfragmente bietet somit keinen Vorteil.

Zur Reduzierung einer Immunantwort und auch für Langzeitversuche über 4 Wochen hat es sich als sinnvoll erwiesen, die NOD-SCID Maus als Wirtstier zu benutzen, da hier die Struktur-erhaltung der Endometriumsfragmente wegen der fehlenden Immunantwort noch hervorragend war. Allerdings hat das NOD-SCID Maus Modell den Nachteil eines hohen Aufwandes einer völlig sterilen Operation.

4.3 Einfluß von Steroidhormonen auf Morphologie, Expression von Steroidhormonrezeptoren und Proliferation des ektopischen Endometriums

Im Hinblick auf die Morphologie der humanen Endometriumsfragmente zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kultur in zyklischen und unbehandelten sowie östrogen-substituierten ovariectomierten Nacktmäusen.

Somit scheint weder die Implantationsrate noch die Erhaltung der Morphologie der endometriotischen Läsionen von dem Vorhandensein von Östrogen abhängig zu sein. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Aoki et al. (1994), die herausfanden, daß das Wachstum des humanen Endometriums unabhängig von dem Zyklusgeschehen der Nacktmäuse ist und auch die Phase des Menstruationszyklus, aus der das Endometrium stammt, keinen Effekt auf die Implantationsrate hat (Nisolle et al. 2000).

Zamah et al. (1984) beobachteten keinen Unterschied in der Entstehung von Nekrosen in den Implantaten in unbehandelten Tieren gegenüber den mit Östrogen behandelten Tieren.

Bei zusätzlicher Behandlung der zyklischen Mäuse mit Progesteron wurden große Implantate und die Bildung von flüssigkeitsgefüllten Endometriumsdrüsen beschrieben, die auf den Erhalt der sekretorischen Aktivität der Implantate hinweisen (Awwad et al. 1999). Diese Phänome konnten in der vorliegenden Arbeit auch ohne zusätzliche Progesterongabe in den Endometriumsfragmenten, die in den zyklischen Mäusen gewachsen waren, beobachtet werden.

In den ektopischen Endometrien, die in zyklischen Mäusen kultiviert wurden, konnten in einem Zeitraum bis zu 14 Tagen (Nacktmäuse) bzw. 28 Tagen (NOD-SCID Mäuse) Steroidhormonrezeptoren nachgewiesen werden. Eine solche Expression fand man jedoch nicht in den endometrialen Fragmenten in ovariectomierten Tieren. Hier konnte lediglich bei einer Probe von 21 Tagen eine geringe Reaktion auf den Östrogenrezeptor gezeigt werden.

Somit ist die Rezeptorausstattung der ektopischen Endometriumsfragmente offensichtlich von der Verfügbarkeit ovarieller Steroidhormone abhängig.

Der Einfluß der Steroidhormone auf die Proliferationsrate der endometrialen Drüsenepithelien konnte mit diesen Befunden korreliert werden. Dies ist dadurch zu erklären, daß die Proliferation des endometrialen Epithels durch Östrogen stimuliert wird (Kimura et al. 1978, Gershenson et al. 1984).

4.4 Invasion und Angiogenese

Die humanen Endometriumsfragmente hefteten sich an das Peritoneum verschiedener Organe der Wirtstiere an. Zudem war das Endometriumgewebe offensichtlich fähig, durch das Peritoneum in das darunterliegende Wirtsgewebe einzuwachsen. Eine solche Invasion zeigte sich am deutlichsten in der Muskulatur der Bauchwand, Tunica muscularis des Darmes und in dem mesenteriale Fettgewebe, während eine Invasion von endometrialen Zellen in der Leber bis zu 7 Tagen Kulturdauer deutlich geringer war. Dies mag daran liegen, daß es sich bei dem Lebergewebe um einen dichten epithelialen Zell-

verband handelt, während eine Invasion zwischen die Muskelfasern einfacher erfolgen kann, da der Gewebeverband locker ist.

Bereits nach 5 Tagen Kulturdauer konnte eine Neubildung und Einsprossung von Gefäßen des Wirtsgewebes in die ektopischen Endometriumsfragmente hinein beobachtet werden.

Diese Angiogenese war besonders stark ausgeprägt bei den Fragmenten, die sich im Bereich des stark durchbluteten Fettgewebes, das die Bauchorgane umgibt, festsetzten; aber auch bei den im Bereich der Operationsnaht an die Sklettmuskulatur adhärierten Fragmenten konnte eine Einsprossung von Kapillaren beobachtet werden.

Im Bereich der Naht spielt höchstwahrscheinlich die beginnende Wundabheilung eine große Rolle, die die Angiogenese wesentlich begünstigt. Im Erwachsenenalter findet eine Neoangiogenese normalerweise nur im Rahmen des Zyklusgeschehens in Folge von Verletzungen oder in der Tumorgenese bei der Anheftung der Metastasen statt (Ferrara 1995).

Jüngste Untersuchungen ergaben, daß die Angiogenese eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Endometriose spielt (Donnez et al. 1998, Abulafia and Scherer 1999, Fujishita et al. 1999).

Ein potentieller Angiogenesefaktor ist der vascular endothelial growth factor (VEGF), der an der physiologischen und an der pathologischen Angiogenese beteiligt ist. VEGF ist sowohl in den Gewebsmakrophagen der ektopischen Endometriumsfragmente als auch in den aktivierten Peritonealflüssigkeitsmakrophagen gefunden worden und wird als Antwort auf die ovariellen Steroide ausgeschüttet (Mc Laren et al. 1996).

Mc Laren et al. (1996) fanden heraus, daß bei Frauen, die an Endometriose erkrankt sind, eine erhöhte Makrophagenaktivität vorliegt.

Es wird vermutet, daß die VEGF-Ausschüttung die Bildung des subperitonealen Gefäßnetzes verstärkt und somit zu einer höheren Implantations- und Überlebensrate der endometriotischen Läsionen führt (Fujimoto et al. 1999). Nisolle et al. (2000) konnten im Nacktmausmodell in allen Endometriumstransplantaten nach 3 Wochen Kultur ein Kapillarnetzwerk in Kombination mit VEGF-positiven Zellen im Drüsenepithel und in geringeren Mengen im endometrialen Stroma nachweisen.

Die Neubildung von Gefäßen in die ektopischen Endometriumsfragmente hinein, die hier bereits nach 5 Tagen Kultur in der Nacktmaus gezeigt werden konnte, eröffnet die

Möglichkeit der Austestung neuer Therapieansätze, die auf einer Hemmung der Angiogenese beruhen. In fortführenden Studien soll gezeigt werden, welche Rolle die Angiogenese für die Entstehung und das Wachstum der ektopischen Endometrien spielt.

5. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, daß in Nackt- bzw. NOD-SCID Mäusen kultivierte humane Endometriumsfragmente ein geeignetes Modell darstellen, um den Einfluß verschiedener (Anti-) Hormone oder (anti-) angiogenetischer Faktoren auf die Entstehung und das Wachstum von Endometrioseherden zu testen und so neue Therapieansätze entwickeln zu können.

Das Modell erlaubt die Untersuchung und die Therapie der ersten zellbiologischen Mechanismen, die zur Endometriose führen, da bereits 2 Tage nach der Transplantation die Anheftung erfolgt und schon nach 5 Tagen Angiogenese zu beobachten ist.

Für Versuche zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte scheint das Nacktmaus-Modell bis zu einem Zeitraum von 14 Tagen sehr geeignet zu sein. Insbesondere für die Testung anti-angiogenetischer Faktoren ist dieses Modell gut geeignet, da bereits 7 Tage nach Implantation eine intensive Neoangiogenese zu beobachten ist; für Experimente über einen längeren Zeitraum ist das NOD-SCID Maus-Modell vorzuziehen, da die Morphologie der Endometriumsfragmente besser erhalten bleibt, was möglicherweise auf die verminderte Abstoßungsreaktion im Vergleich zu den Nacktmäusen zurückzuführen ist.

Wie lange man die Endometriumsfragmente mit einem guten morphologischen Erhaltungszustand in den NOD-SCID Mäusen kultivieren kann, bleibt weiteren Versuchen vorbehalten.

6. Summary

Human endometrial tissue grown in nude and NOD-SCID mice seems to be a suitable model to test the effect of different (anti-)hormones or (anti-)angiogenetic factors on the development and the growth of ectopic endometrium fragments.

Furthermore this model allows the investigation of the cell biological mechanisms involved in the very early events of implantation and persistence of the endometrial lesions. Attachment of the fragments occurs already 2 days after implantation and neoangiogenesis derived from the host tissue is observed after 5 days.

The endometriotic lesions represent an intact morphological structure with glandular epitheliums surrounded by stroma up to 14 days in nude mice. Later on, the glands reveal a more cystic appearance and the epithelium cells are more flattened.

A very good morphological appearance of the endometrial fragments is observed in NOD-SCID mice even after 4 weeks of culturing. In conclusion, implantation of human endometrial fragments into nude mice seems to be a promising model to develop new therapeutical concepts like the anti-angiogenetic factors, and the NOD-SCID mice model seems to be suitable for long-term experiments.

6. Literaturverzeichnis:

- Albulafia O, Scherer DM. Angiogenesis of endometrium. Obstet Gynecol 1999; 94:148-153
- Aoki D, Karsuki Y, Shimuzu A, Kakinuma C, Nozawa S. Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. Obstet Gynecol 1994; 83:220-228.
- Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST, Isaacson K. The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. Human Reprod 1999; 14:3107-3111.
- Barbieri RL. New therapy for endometriosis. N. Engl. J Med. 1988; 318:512.
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998, 13:1686-1690.
- Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. Breast Cancer Res.Treatm 1995, 36: 127-137.
- Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Wen H, Tamaya T. Angiogenesis in endometriosis and angiogenic factors. Gynecol Obstet Invest 1999; 48:14-20.
- Fujishita A, Hasuo A, Khan KN, Masuzaki H, Nakashima H, Ishimaru T. Immunohistochemical study of angiogenic factors in endometrium and endometriosis. Gynecol Obstet Invest 1999, 48:36-44.
- Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, Baumann R, Starzinski-Powitz A. Nonmalignant epithelial cells, potentially invasive in human endometriosis, lack the human suppressor molecule E-cadherin. Am J Pathol 1997; 150:461-467.
- Geipel P. Weiterer Beitrag zur Kenntnis des dezidualen Gewebes. Arch.Gynäkol.1927, 131:650-700.
- Gerschenson LE, Conti CJ, Depaoli JR, Lieberman R; Lynch M, Orlicky D, Rivas Berrios A. Estrogen and progesterone regulation of proliferation and differentiation of rabbit uterine epithelium. Prog Clin Biol Res 1984, 142:119-132.
- Grümmer R. 1994. Entwicklung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung zellbiologischer Mechanismen der Invasion des menschlichen Trophoblasten. Diss.1994, 27.

- Javert CT. Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogeneous metastasis. *Cancer* 1949; 2:399-410.
- Kimura J, Obata T, Okada H. Steroidal control mechanism of cell proliferation in mouse uterine epithelium. *Endocrinol Jpn* 1978; 25:7-12.
- Kistner RW, Siegler AM, Behrman SJ. Suggested classification for endometriosis: Relationship to infertility. *Fertil Steril* 1977; 28: 1008-1010.
- Lessey BA, Young D. Integrins and other cell adhesion molecules in endometrium and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; 15:291-299.
- Ledger W.L. Endometriosis and infertility: an integrated approach. *Int J Gynaecol Obstet* 1999; 64:S33-40.
- Liu DT, Hitchcock A. Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:859-862.
- Mac Kenzie WF, Casey HW. Animal model of human disease: endometriosis in rhesus monkeys. *Am J Pathol* 1975; 80:341-344.
- Mc Laren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Millican SA (1996). Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98: 482-489.
- Meyer R. Über eine adenomatöse Wucherung der Serosa in einer Bauchnarbe. *Z. Geburtsh. Gynäkol.* 1903, 49:32-41.
- Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, Jadoul P, Donnez J. Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Human Reprod* 2000; 15:572-577.
- Phillips RA, Jewett MA, Gallie BL. Growth of human tumors in immunodeficient SCID mice and nude mice. *Curr Top Mikrobiol Immunol* 1989; 152:259-266.
- Regidor PA, Vogel C, Regidor M, Schindler AE, Winterhager E. Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium. *Human Reprod Update* 1998; 4:710-718.
- Schindler AE. Endometriose und Fertilitätsstörungen. *Der Frauenarzt* 1995; 3:211-214.
- Schweppe KW, Dmowski WP, Rolland R. Endometriose, Pathophysiologie, Klinik

und neue Behandlungsmöglichkeiten. Aktuelles Wissen Hoechst. Hoechst, Frankfurt am Main 1990.

- Scotti S, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E. Reduced proliferation and cell adhesion in endometriosis. *Molec Hum Reprod* 2000; 6:610-617.
- Tabizadeh S, Miller S, Dodson WC, Satyaswaroop PG. An experimental model for endometriosis in athymic mice . *Frontiers Biosci* 1999; 4:C4-9.
- Van der Linden PJQ, De Groeij AF, Dunselman G.A. Endometrial cell adhesion in an in vitro model using amniotic membranes. *Fert Steril* 1996; 65:6-80.
- Wheeler JM. Epidemiology of endometriosis associated infertility. *J Reprod Med* 1989; 34:41-46
- Wheeler JM, Knittle JD, Miller JD. Depot leuprolide versus danazol in treatment of women with symptomatic endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 167:1367-1371.
- Wortis HH. Immunologic responses of nude mice. *Clin Exp Immunol* 1971; 8:305-317.
- Zamah NM, Dodson MG, Stephens LC, Buttram VC Jr; Besch PK, Kaufman RH. Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 149:591-597.

Danksagung:

Ich danke Frau Prof. Dr. E. Winterhager für die Überlassung des Themas und ihre anregende, dynamische sowie kritische Hilfestellung und Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Leiser danke ich für die Überlassung des Themas und die allzeit gewährte Hilfe beim Anfertigen der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. R. Grümmer. Sie lieferte zahlreiche Anregungen zur konkreten Gestaltung des Themas und stand jederzeit zur Diskussion aller größeren und kleineren Probleme zur Verfügung.

Danken möchte ich Herrn Dr. H. Hess-Stumpp, Schering AG in Berlin, für die fachkundige Beratung und Unterstützung während dieser Arbeit.

Aus der Frauenklinik des Universitätsklinikums Essen möchte ich Herrn Prof. Dr. A. E. Schindler sowie Herrn PD Dr. P. A. Regidor für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial danken.

Herrn Prof. Dr. K. Militzer und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Arbeit mit den Versuchstieren.

Ich bedanke mich bei Herr Dr. M. Fläßhove und Frau Dr. T Trarbach aus der Abteilung für Innere Medizin des Universitätsklinikums Essen für die Möglichkeit, mit den NOD-SCID-Mäusen arbeiten zu dürfen.

Für die ausgiebige Einweisung in die histologischen Arbeiten möchte ich mich bei Frau U. Tolka bedanken.

Mein Dank gilt ferner Herrn D. Kittel für die schnelle Ausführung aller Fotoarbeiten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Anatomie des Universitätsklinikums Essen danke ich für die gute Atmosphäre und ihre Hilfe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Abschließend möchte ich mich bei meinem Mann und meiner Tochter für ihre Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.