

**Kultur von humanem Endometrium in der Nacktmaus
als Modell für die peritoneale Endometriose:
Morphologische und immunhistochemische Charakterisierung.**

Frauke Schwarzer

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Anatomie

Kultur von humanem Endometrium in der Nacktmaus als Modell für die peritoneale
Endometriose: Morphologische und immunhistochemische Charakterisierung.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Frauke Schwarzer
aus Mülheim an der Ruhr

2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1.Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. E. Winterhager
2.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. R. Kimming

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Mai 2004

Veröffentlichung von Teilergebnissen dieser Arbeit in

Grümmer, R., Schwarzer, F., Bainsczyk, K., Hess-Stumpp, H., Regidor, P.A.,
Schindler, A.E., Winterhager, E. (2001):
Peritoneal endometriosis: validation of an in- vivo model.
Hum Rep, 16, 1736-1743

Schwarzer, F., Bainsczyk, K., Hess-Stumpp, H., Regidor, P.A., Schindler, A.E.,
Winterhager, E., Grümmer, R. (2001):
An experimental in vivo model for investigation of peritoneal endometriosis.
Ann Anat, Suppl. 183, 290

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	
1.1 Das Krankheitsbild der Endometriose	1
1.2 Die Therapie der Endometriose	4
1.3 Tiermodelle zur Untersuchung der Endometriose	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit	5
2 Material und Methoden	
2.1 Patientinnenkollektiv	7
2.2 Aufarbeitung des Endometriumgewebes	7
2.3 Transplantation des Endometriums in die Nacktmaus	8
2.3.1 Versuchstiere	8
2.3.2 Transplantation des Endometriums	8
2.3.3 Behandlung mit Antigestagen bzw. selektivem Östrogen Rezeptor Modulator (SERM)	9
2.3.4 Aufarbeitung der Endometriumherde	10
2.4 Morphologie	10
2.4.1 Morphologische Beurteilung der endometrialen Läsionen	10
2.4.2 Immunhistochemie	11
2.4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis mittels Peroxidase DAB (Diaminobenzidin) - Färbung	11
2.4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis mittels Immunfluoreszenz	12
2.4.2.3 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	13
2.5 Lösungen und Chemikalien	14
2.5.1 Chemikalien	14
2.5.2 Zusammensetzung der Lösungen	15

3 Ergebnisse

3.1	Lokalisation und Anheftungsrate der Endometriumfragmente in der Nacktmaus	16
3.1.1	Vergleich der Anheftungsrate von frei in die Bauchhöhle eingebrachten und fixierten Endometriumfragmenten	16
3.1.2	Vergleich der Anheftungsrate von Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose	20
3.2	Morphologie des in der Nacktmaus kultivierten Endometriumgewebes	21
3.3	Histologische Charakterisierung der humanen Endometriumfragmente durch zellbiologische Differenzierungsmarker	25
3.3.1	Cytokeratin und Vimentin	25
3.3.2	E- Cadherin	29
3.3.3	Connexin 26 und Connexin 43	29
3.3.4	Angiogenese in den in der Nacktmaus kultivierten Endometriumfragmenten	32
3.4	Lokalisation, Morphologie und Angiogenese der Endometriumfragmente nach Behandlung der Nacktmäuse mit SERM bzw. Antigestagen	35
3.4.1	Lokalisation	35
3.4.2	Morphologie	35
3.4.3	Angiogenese	36

4 Diskussion

4.1	Anheftung und Lokalisation der Endometriumfragmente	39
4.2	Morphologie der Endometriumfragmente	41
4.3	Angiogenese	43
4.4	Einfluss von SERM und Antigestagen auf Morphologie und Angiogenese der in der Nacktmaus kultivierten Endometriumfragmente	44

5	Schlußfolgerungen	46
6	Zusammenfassung	47
7	Literaturverzeichnis	48
8	Anhang	57
9	Lebenslauf	58

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Endometriose

Das Krankheitsbild der Endometriose ist definiert als das Auftreten von Endometriumgewebe außerhalb des Uterus. Es handelt sich hierbei um eine gutartige gynäkologische Erkrankung, bei der die meist im kleinen Becken gelegenen Endometrioseherde den gleichen histologischen Charakter aufweisen wie das Endometrium im Uterus. Die Endometrioseherde können auch außerhalb des kleinen Beckens und in vereinzelt Fällen sogar außerhalb des Bauchraumes auftreten. Als Adenomyosis (früher: Endometriosis interna) wird das Auftreten von Endometrium im Myometrium des Uterus bezeichnet. Die Endometrioseherde finden sich am häufigsten in den Ligamenta sacrouterina (60 – 70 %) und den Ovarien (50 – 60 %). Es sind jedoch häufig auch der Douglas Raum (25 - 30 %) sowie die Blase und die Eileiter betroffen. Ein Mitbefall von verschiedenen Anteilen des Darmes oder der Ureteren kann bei vorhandener Beckenendometriose 20 % betragen. Eine Endometriose außerhalb der Genitalorgane ohne Befall des Beckens kommt selten, ein Befall außerhalb des Bauchraumes, z.B. Endometrioseherde in der Lunge, sehr selten vor (Schweppe 1984).

Endometriose betrifft vor allem Frauen vor der Menopause, von ihnen entwickeln ungefähr 10 – 25 % eine Endometriose (McLaren und Prentice 1996, Moghissi 1999). Die Endometriose zeichnet sich durch klinische Symptome wie Dysmenorrhoe, Schmerzen, Infertilität und Dyspareunie aus (McLaren und Prentice 1996), und kann nur durch eine Laparoskopie bzw. eine Laparotomie sicher diagnostiziert werden. Die Endometrioseherde erscheinen laparoskopisch als weiße, rote, klare oder gelbe Papeln, als rote hämorrhagische Knoten, blau-schwarze Zysten oder weißlich- fibrotische Herde (McLaren und Prentice 1996). Frühe Gewebeveränderungen fallen durch ihre pink-rote Färbung und intensive Vaskularisation auf. Sie zeigen eine hohe mitotische Aktivität und enthalten Stroma und Drüsen ohne fibrotische Anteile (Nisolle et al. 1993, McLaren und Prentice 1996). Sie können sich zu den typischen blau-schwarzen Veränderungen weiter entwickeln, die weniger Drüsen und Stroma enthalten (McLaren und Prentice 1996).

Abgeheilte Endometrioseherde sind fibrotisch-weiß, zeigen keine mitotische Aktivität mehr und enthalten nur noch Reste inaktiver Drüsen und Stroma (Nisolle et al. 1993, McLaren und Prentice 1996). Die Schwere der Erkrankung wird nach Ausdehnung und Art der Endometrioseherde nach der American Fertility Society (1985) in vier Schweregrade unterteilt. Die Eindringtiefe der Herde scheint mit ihrem klinischen Erscheinungsbild zusammenzuhängen, wobei tiefe Herde mit einer Entzündungsreaktion und mit Schmerzen, oberflächliche Gewebeveränderungen eher mit Infertilität einhergehen (Moghissi 1999).

Es sind verschiedene Theorien zur Entstehung der Endometriose bekannt, die auch teilweise miteinander kombiniert werden (Schweppe 1984). Die Transformationstheorie nimmt eine Transformation des Mesothels der Müller Gänge an. Während der Embryonalphase verbleibt Mesothel der Müller Gänge in der Bauchhöhle und wandelt sich anschließend in Endometrium um (Russell 1899, Thomas und Prentice 1992). Diskutiert wird auch eine Form der Metaplasie. Hierbei sollen Zellen des Coelomesothels, aus welchem später das Peritoneum gebildet wird, eine metaplastische Umwandlung zu Endometrium vollziehen (Meyer 1919, Thomas und Prentice 1992). Allgemein anerkannt ist jedoch inzwischen die Theorie der retrograden Menstruation von Sampson (1921). Diese Theorie postuliert, dass während der Menstruation Endometrium durch die Eileiter in die Bauchhöhle gelangt, sich dort am Peritoneum anheftet und die oben beschriebenen Erscheinungsformen der Endometrioseherde hervorruft. Eine Möglichkeit der Verschleppung von Endometrium durch mechanische Faktoren z.B. bei Operationen und durch lymphogenen und venösen Transport wird ebenfalls diskutiert (Sampson 1925, Halban 1924, Thomas und Prentice 1992).

Man geht davon aus, dass das Phänomen der retrograden Menstruation bei ca. 90 % aller Frauen um die Zeit der Menstruation auftritt (Halme et al. 1984). Dennoch tritt die Endometrioseerkrankung nur bei 10 - 25 % aller Frauen auf (McLaren und Prentice 1996). Somit müssen Unterschiede in den zellbiologischen Mechanismen existieren, die bei einem Teil der Frauen zur Ausbildung von Endometriose führen. Diese molekular- und zellbiologischen Mechanismen, die der Entstehung der Endometriose zugrunde liegen, sind noch nicht bekannt.

Es werden einige Faktoren diskutiert, die das Entstehen einer Endometriose begünstigen können. Zu diesen Faktoren zählen sowohl eine abweichende Anatomie

des Genitaltraktes, als auch zell- und molekularbiologische Veränderungen im Endometrium und/oder im peritonealen Milieu der Frauen, die von Endometriose betroffen sind. So können uterine Fehlentwicklungen, die den normalen anterograden Reflux der Menstruation unterbrechen ein Faktor für die Entwicklung einer Endometriose sein (Vinatier et al. 2000). Bei manchen Frauen mit einer Endometriose werden Wellen von retrograden Kontraktionen der Uterusmuskulatur und der Eileiter festgestellt (Salamanca und Beltran 1995). Ebenso kann der Tonus der uterotubulären Verbindung vermindert sein (Ayers und Friedenstab 1985).

Vor allem zell- und molekularbiologische Abweichungen scheinen bei der Entwicklung der Endometriose eine wichtige Rolle einzunehmen. Wingfield et al. (1995) stellten eine erhöhte Proliferation der Endothelzellen sowie der Stroma- und Epithelzellen im Endometrium von Frauen mit Endometriose fest. Zudem ist die zelluläre Immunabwehr durch die Aktivität der die Natural Killer (NK) Zellen im Endometrium von Frauen mit einer Endometriose Erkrankung erniedrigt (Salamanca und Beltran 1995). Donnez et al. (1998) fanden eine erhöhte Konzentration des Vascular endothelial growth factor (VEGF) im Endometrium von Frauen mit Endometriose.

Auch in der peritonealen Umgebung, in der sich die Endometriose in den meisten Fällen entwickelt, werden Veränderungen von Frauen mit Endometriose gegenüber Frauen ohne Endometriose gefunden: So ist die Konzentration von Makrophagen und aktivierten Makrophagen und ihren Sekretionsprodukten in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen, die von Endometriose betroffen sind, erhöht (Koninckx et al. 1998). Ebenso finden sich dort erhöhte Werte für bestimmte Prostaglandine, einige Komplementfaktoren und Zytokine (Ramey und Archer 1993).

Es zeigt sich hier also, dass eine Vielzahl von Einflussfaktoren auf die Entstehung einer Endometriose einwirken können, was dazu beigetragen hat, dass diese Erkrankung bis heute noch nicht vollständig in ihrer Entstehung und ihrem Verlauf verstanden ist. Auch wenn es bereits einige Therapiekonzepte zur Behandlung der Endometriose gibt, ist eine vollständige Rezidivfreiheit in den meisten Fällen nicht zu gewährleisten (Wheeler et al. 1993).

1.2 Die Therapie der Endometriose

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Endometriose zu behandeln. Hierbei werden sowohl schmerztherapeutische als auch chirurgische und vor allem medikamentöse Ansätze miteinander kombiniert. Aufgrund der klinischen Beschwerden unterziehen sich die meisten Patientinnen einer Laparoskopie, bei der identifizierte Endometriumherde oder Zysten entfernt werden. Weiterhin gibt es die Möglichkeit einer hormonellen Therapie, die entweder als alleinige Therapie oder in Kombination mit einer chirurgischen Therapie durchgeführt wird.

Die hormonelle Therapie erfolgt mit Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) Agonisten, Danazol oder Gestagenen (auch in Kombination mit Östrogenen). Diese Substanzen supprimieren die Gonadotropinsekretion und damit die ovarielle Funktion und den Menstruationszyklus. Da die Effektivität der ovariellen Hemmung individuell verschieden ist, kommt es in unterschiedlichem Ausmaß zur Regression der ektopen Endometriumherde. Alle bisher bekannten Behandlungsmöglichkeiten führen jedoch in den meisten Fällen nicht zu einer Ausheilung, sondern lediglich zu einer Besserung einzelner Symptome bei einer hohen Rezidivrate von 5-10 % innerhalb eines Jahres (Schweppe et al. 1990). Eine Ursache hierfür könnte in einem bereits veränderten Differenzierungsstatus des uterinen Endometriums liegen. (Schweppe et al. 1990, Wheeler 1993). Um die Mechanismen der Entstehung der Endometriose sowie den Effekt verschiedener Substanzen und Medikamente auf die zellbiologischen Parameter des Endometrium untersuchen zu können, braucht man experimentelle Modelle.

1.3 Tiermodelle zur Untersuchung der Endometriose

Die Endometriose kommt als physiologisches Ereignis nur bei Menschen und Affen vor (Tabibzadeh et al. 1999). Versuche an Menschen sind aus ethischen Gründen nicht bzw. nur sehr eingeschränkt möglich. Ridley und Edwards (1958) applizierten Patientinnen subkutan Endometrium in das Abdominalfett, um die Entstehung von Endometrioseherden zu beobachten. Versuche an nicht humanen Primaten sind kosten- und zeitintensiv. Scott et al. (1957) warteten bis zu drei Jahre auf das physiologische Erscheinen der Endometriose bei Makkaken.

Als weitere Tiermodelle zur Erforschung der Erkrankung wurden bis jetzt Kaninchen und Ratten eingesetzt. In ihnen wurde eine Endometriose durch eine Autotransplantation von Endometrium in die Peritonealhöhle induziert (Jacobson 1922, Jones 1984). Mori et al. 1991 dagegen versuchten eine Endometriose in Mäusen durch eine Behandlung mit Prolaktin hervorzurufen.

Wichtig jedoch ist es vor allem humanes Endometrium in einem Tiermodell untersuchen zu können. Aus diesem Grund werden immundefiziente Mäuse, wie die Nacktmaus oder SCID (severe combined immunodeficiency) Maus eingesetzt. Der Nacktmaus fehlt durch eine angezüchtete Thymusaplasie die Möglichkeit immunkompetente T- Zellen zu bilden. Sie verfügt jedoch über ein intaktes B- Zell Abwehrsystem und eine weiter bestehende Aktivität der Natural Killer T- Zellen (Hebermann 1978). Die SCID Maus hingegen verfügt weder über ein intaktes T- noch B-Zell System (Bosma 1989).

Zamah et al. (1984) transplantierten Endometrium einerseits subkutan (Versuchsdauer bis zu 70 Tagen), andererseits in die Bauchhöhle der Nacktmaus, wo es bis zu 56 Tage kultiviert wurde. Bergqvist et al. (1985) applizierten Nacktmäusen humanes Endometrium subkutan bei einer Versuchsdauer von 70 Tagen. Nisolle et al. (2000 b) transplantierten Endometrium in die Bauchhöhle von Nacktmäusen. Sie beschrieben einen Versuchszeitraum von 5 Tagen. Balczyk (2001) kultivierte 21 Tage Endometrium in der Bauchhöhle von Nacktmäusen.

Die Nacktmaus stößt aufgrund ihrer Immundefizienz das transplantierte Fremd- gewebe über einen langen Zeitraum nicht ab. Versuchszeiträume bis zu 10 Wochen wurden von Bergqvist et al. (1985) beschrieben.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine morphologisch und zellbiologische Analyse im Hinblick auf Differenzierungsmarker und Angiogenese von in der Nacktmaus kultiviertem Endometriumgewebe durchzuführen und damit das Modell für zukünftige Untersuchungen zu validieren. Zu diesem Zweck wurde humanes Endometrium zum einen frei in die Bauchhöhle eingebracht, zum anderen an bestimmten Lokalisationen in der Bauchhöhle der Nacktmaus fixiert und dort über einen Zeitraum von zwei Tagen bis zu drei Wochen kultiviert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung wurden die Morphologie, zellbiologische Parameter

sowie die durch die Endometriumfragmente induzierte Angiogenese untersucht. Auf der Grundlage dieser Analysen sollte ein Ausblick auf die mögliche Erprobung medikamentöser Therapiekonzepte in diesem Nacktmausmodell gegeben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Das für die Experimente verwendete Endometrium wurde aus Kürettagen oder nach Hysterektomie aus dem entnommenen Uterus gewonnen. Das Endometrium stammte von 16 Patientinnen der gynäkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Essen unter der Leitung von Prof. Dr. Schindler, von denen 9 an Endometriose erkrankt waren. Alle Patientinnen waren praemenopausal.

In 15 Fällen stammte das gewonnene Gewebe aus der frühen und späten Proliferationsphase, in einem Fall aus der frühen Sekretionsphase des Zyklus. Die Zuordnung zur Phase des Menstruationszyklus geschah nach den Kriterien von Noyes et al. (1950) in bezug auf Drüsenmorphologie, Vakuolisierung und Sekretion ins Drüsenlumen.

Bei 12 Patientinnen waren bestehende Unterbauchschmerzen, teilweise assoziiert mit Dysmenorrhöen, Meno- Metrorrhagien und Dyspareunie der Grund für die Laparoskopie. In dieser Gruppe lag zusätzlich bei einer Patientin eine primäre Sterilität vor, eine andere Patientin hatte eine bereits bekannte Endometriose. Bei einer Patientin bestand eine sekundäre Sterilität mit Kinderwunsch. Bei zwei Patientinnen wurde eine Ovarialzyste, bei einer Patientin ein Uterus myomatosus behandelt. Bei acht Patientinnen wurde eine Endometriose im Verlauf einer Laparoskopie festgestellt.

Mit dem Routinelabor erfasste Hormonwerte, Informationen zu vorangegangenen Operationen und medikamentöser Behandlung wurden aus den Krankenakten entnommen.

2.2 Aufarbeitung des Endometriumgewebes

Das Endometrium wurde unmittelbar nach der Entnahme zum Transport in das Labor in Mosconalösung (s. 2.5.2) verbracht. Es wurde unter sterilen Bedingungen mit Mosconalösung von Blutkoageln gereinigt und mit einem Skalpell in Fragmente von ca. 1 x 2 mm geteilt. Von diesem nativen Material wurde je ein Fragment für die Paraffineinbettung in 10% Formalin fixiert bzw. in Stickstoff eingefroren und bei - 20° C gelagert.

Die übrigen Fragmente wurden in Nährmedium (s. 2.5.2) bei 37° C verbracht. Sie wurden in den meisten Fällen sofort, spätestens jedoch nach 3 Stunden in die Nacktmaus transplantiert.

2.3 Transplantation des Endometriums in die Nacktmaus

2.3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche Nacktmäuse (Han: NMRI nu/nu) aus der Zucht des zentralen Tierlaboratoriums der Universitätsklinik Essen (Prof. Dr. Militzer) verwendet. Bei Versuchsbeginn hatten die Nacktmäuse ein Alter von etwa zwei Monaten. Die Nacktmäuse wurden in einem keimfreien Umfeld unter kontrollierten Umweltbedingungen und regulierten Tag- / Nachtzyklen (je 12 Stunden) gehalten. Futter, Einstreu und verwendete Geräte wurden autoklaviert bzw. sterilisiert. Es wurden insgesamt 39 Tiere verwendet. Die Experimente wurden nach § 15 des Tierschutzgesetzes genehmigt und ausgeführt.

2.3.2 Transplantation des Endometriums

Das Endometrium wurde wie unter Punkt 2.2 beschrieben vorbereitet.

Die Nacktmäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 17 µl 2,5 % Avertin (s. 2.5.2) /g Körpergewicht betäubt und unter sterilen Bedingungen laparotomiert.

Die Endometriumfragmente wurden auf zwei verschiedene Arten in der Nacktmaus platziert:

- a) 3 bis 11 Endometriumfragmente wurde mit einer Pinzette frei im Bauchraum der Maus platziert.
- b) Es wurde jeweils 1 Fragment an Darm, Mesenterialfett und Bauchwand mit Hilfe von Nahtmaterial (Ethicon, V-133H) fixiert. Hierzu wurden die Fragmente in einer Schlinge aus Nahtmaterial befestigt und an Bauchwand und Mesenterialfett angenäht. Zur Fixierung an den Darm wurde um das Darmrohr eine Schlinge aus Nahtmaterial gelegt, wobei darauf geachtet

wurde das Darmlumen und die Motilität des Darmes in keiner Weise einzuschränken. Bei der Fixierung der Fragmente mit Nahtmaterial wurde zudem darauf geachtet, außer den durch die Nadel entstehenden Läsionen keine weiteren unnötigen Reizungen zuzufügen.

Der Bauchschnitt wurde danach mit Einzelknopfnähten verschlossen und einer täglichen Wundkontrolle unterzogen.

Bei 30 Tieren wurden Endometriumfragmente ohne weitere Behandlung entweder frei in den Bauchraum eingebracht oder fixiert (s.o.). Von diesen hatten nach einem Versuchszeitraum von 6 bzw. 7 Tagen vier Tiere Endometrium von Patientinnen mit Endometriose erhalten, vier weitere Nacktmäuse hatten Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose (s. 3.1.2) erhalten.

2.3.3 Behandlung mit Antigestagen bzw. selektivem Östrogenrezeptor Modulator (SERM)

Die Nacktmäuse wurden wie unter Punkt 2.3.2 beschrieben vorbereitet. Insgesamt wurden neun Tiere in drei Versuchsreihen verwendet. In den ersten zwei Versuchsreihen wurden bei je drei Tieren jeweils drei Fragmente angenäht (s. 2.3.2 b) und zusätzlich drei Fragmente frei im Bauchraum platziert. In der dritten Versuchsreihe erhielten drei Tiere jeweils 13 Fragmente, die frei im Bauchraum platziert wurden. Nach der Transplantation der Endometriumfragmente wurden die Nacktmäuse zusätzlich mit einem Antigestagen (Schering, ZK 230211) oder einem selektiven Östrogenrezeptor Modulator (SERM, Schering, ZK 186619) behandelt. Die Substanzen wurden in Ethanol gelöst und mit Arachisöl (Bombastus Werke) als Trägersubstanz angesetzt (s. 2.5.2).

Pro Versuchsreihe erhielt ein Tier jeweils das Antigestagen (90 µg/Tier), eins den SERM (90 µg/Tier) und das dritte ein entsprechendes Volumen aus Ethanol und Arachisöl als Kontrolle. Die Applikation erfolgte subkutan über einen Zeitraum von 6 Tagen im 24 Stunden Rhythmus. Am siebten Tag wurden die Tiere getötet und einer gründlichen Sektion unterzogen (s. 2.3.4), wobei zusätzlich Körpergewicht, Uterus- und Ovargewicht registriert wurden.

2.3.4 Aufarbeitung der Endometriumherde

Nach 2, 4, 6, 7, 9, 14 oder 21 Tagen wurden die Versuchstiere mittels zervikaler Dislokation getötet und einer gründlichen Sektion unterzogen. Hierzu wurde die Bauchhöhle mittels Bauchschnitt eröffnet und die Organe zunächst in normgerechter Lage auf endometriale Läsionen hin untersucht. Danach wurden alle Organe des Bauchraumes und des retroperitonealen Raumes einzeln auf makroskopisch sichtbare endometriale Läsionen hin analysiert. Die fixierten Fragmente waren durch das Nahtmaterial gut gekennzeichnet und konnten sofort aufgefunden werden.

Die makroskopisch sichtbaren endometrialen Läsionen wurden herauspräpariert und entweder für die Paraffineinbettung in 10 % Formalin fixiert oder in Tissue Tek (Sakura O.C.T.TM Compound) über flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -20° C gelagert.

2.4 Morphologie

2.4.1 Morphologische Beurteilung der endometrialen Läsionen

Das in Stickstoff fixierte Gewebe wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -20° C gelagert. Das in Formalin (10 %) fixierte Gewebe wurde nach einer Fixierungszeit von maximal 12 Stunden mit einem Einbettautomaten (Shandon) in Paraffin eingebettet.

Von allen Geweben wurden mit einem Mikrotom (Jung AG) bzw. einem Gefriermikrotom (Leitz) 7-8 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Toluidinblau (Gefrierschnitte) bzw. mit Hämatoxylin-Eosin (Paraffinschnitte) angefärbt, um histologisch den endometrialen Charakter der makroskopisch erkannten Läsion zu bestätigen.

2.4.2 Immunhistochemie

2.4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis mittels Peroxidase DAB (Diaminobenzidin) – Färbung

Nachdem die makroskopisch erkannte endometriale Läsion auch histologisch gesichert werden konnte, wurden verschiedene zellbiologische Marker an 7-8 µm dicken Gefrier- bzw. Paraffinschnitten immunhistochemisch nachgewiesen. Gefrierschnitte wurden auf Super Frost Objektträgern (Menzel) aufgezogen und nach einer kurzen Phase der Antrocknung 5 Minuten bei -20^o C in 96 % Alkohol fixiert. Es folgte ein Waschgang mit PBS (Phosphate Buffered Saline) (5 Minuten), eine 5-minütige Inkubation mit H₂O₂ zur Blockade der endogenen Peroxidase Aktivität und wiederum ein 5-minütiger Waschgang mit PBS.

Danach wurden die Schnitte mindestens 30 Minuten, in der Regel jedoch 12 Stunden in PBS mit BSA (0,5%) (Bovine Serum Albumin) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen bei Raumtemperatur inkubiert.

Paraffinschnitte wurden in einem Histoclearbad (2 x 5 Minuten), dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Isopropanol, 1 Minute; 96% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua dest. jeweils 3 Minuten) entparaffiniert und mit PBS gewaschen (5 Minuten). Die nachfolgenden Schritte stimmen für Paraffin- und Gefrierschnitte überein. Die Präparate wurden auf dem Objektträger mit einem Markierstift (Dako Pen, Kat. No. S2002) umkreist, um so den Antikörper möglichst gezielt auf den Gewebeschnitt aufzutragen.

Die so vorbereiteten Präparate wurden für mindestens eine Stunde in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper (s. 2.4.2.3) inkubiert, der zuvor mit Antikörperverdünnung (s. 2.5.1) verdünnt wurde. Nach der Inkubation wurden die Präparate 5 Minuten mit PBS gespült und für 30 Minuten bzw. bei Verwendung eines Kits (s. 2.4.2.3) für 15 Minuten der Sekundärantikörper aufgetragen. Der Kit von Dako wurde ausschließlich bei Paraffinschnitten, die mit Cytokeratin oder Vimentin von Dako inkubiert wurden, verwendet. Nachdem wieder 5 Minuten mit PBS gespült wurde folgte für 30 Minuten bei Verwendung eines Detektionssystems (abhängig vom Sekundärantikörper, s. 2.4.2.3) bzw. 15 Minuten bei Verwendung des Kits (s.o.) der nächste Inkubationsschritt. Nach erneuter Spülung mit PBS (5 Minuten), wurden die Präparate für 5-10 Minuten mit dem Chromogen (DAB)

inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Sie wurden nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol→ 96% Ethanol→ Isopropanol → Histoclear) fixiert und mit Histomount eingedeckt.

2.4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis mittels Immunfluoreszenz

Die Gefrierschnitte wurden auf Deckgläser (Superior) aufgezogen, kurz angetrocknet und in einer 12-Well-Inkubationskammer (Becton Dickinson) bei -20° C mit 96% Al-kohol fixiert (5 Minuten). Alle weiteren Schritte fanden in der 12-Well-Inkubationskammer bei Raumtemperatur statt. Nach einem Waschgang mit PBS (5 Minuten) wurden die Schnitte mindestens 60 Minuten, meist jedoch 12 Stunden in PBS-BSA inkubiert.

Es folgte die Inkubation mit dem Primäantikörper (1 Stunde) und drei Waschgänge von jeweils 5 Minuten mit PBS-BSA. Nach dem Waschen wurden die Schnitte 45 Minuten mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörper inkubiert, wobei die 12- Well-Kammer wegen der Lichtempfindlichkeit des Antikörpers mit Folie verdunkelt wurde. Die Schnitte wurden anschließend 3 x 5 Minuten mit PBS-BSA und 3 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen und mit Vectashield eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Axiophot mit Fluoreszenzeinrichtung.

2.4.2.3 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Folgende Antikörper wurden nur an Gefrierschnitten in Verbindung mit einer DAB Färbung verwendet :

Primär-antikörper	Verdünnung	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Detektionssystem
rat anti-mouse panendothelial Antigen (PAN) Pharmingen 09921D	1:100	rabbit anti-rat,biotinyliert Dako E 0468	1:400	StreptABCComplex/HRP (biotinylated horse radish peroxidase), Dako Z 0113
rat anti-mouse PECAM-1 (CD 31), MEC 13.3 ¹ , Pharmingen 01951A	1:200	rabbit anti-rat, biotinyliert Dako E 0468	1:400	StreptABCComplex/HRP (biotinylated horse radish peroxidase), Dako Z 0113
rabbit anti-human Cytokeratin, Zymed 00250015	1:1000	goat anti-rabbit, biotinyliert Dako E 0432	1:200 - 1:400	StreptABCComplex/HRP (biotinylated horse radish peroxidase), Dako Z 0113

Folgende Antikörper wurden an Gefrierschnitten in Verbindung mit einer Immunfluoreszenzfärbung verwendet:

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
mouse anti-human E-cad, Vestweber (1984)	1:5	rabbit anti-mouse, FITC konjugated Dako F 0232	1:200
rabbit anti-human Cx 26, Traub et al. (1989)	1:25	swine anti-rabbit, FITC konjugated, Dako F 0205	1:200
rabbit anti-human Cx 43, Traub et al. (1994)	1:25	swine anti-rabbit, FITC konjugated, Dako F 0205	1:200

E-Cadherin Antikörper wurde freundlicherweise von D. Vestweber, Connexin 26 und 43 Protein Antikörper wurden freundlicherweise von O.Traub zu Verfügung gestellt.

Folgende Antikörper wurden an Paraffinschnitten in Verbindung mit einer DAB Färbung verwendet:

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung	Detektionssystem	Verdünnung
rabbit anti-human von-Willebrand-Faktor (vWF) Dako A 0082	1:200	goat anti-rabbit, biotinyliert Dako E 0432	1:200 - 1:400	PAP rabbit (peroxidase anti-peroxidase), Dako Z 0113	1:50
mouse anti-human Cytokeratin, Dako M0821	1:100	Universal LSAB+ Kit (labelled streptavidin biotin) anti rabbit/mouse/goat, Dako K 0690			
Monoklonal Maus Anti-Human, Vimentin Dako M0725	1:100	Universal LSAB+ Kit (labelled streptavidin biotin) anti rabbit/mouse/goat, Dako K 0690			

2.5 Lösungen und Chemikalien

2.5.1 Chemikalien

- 2,2,2- Tribromethanol, Aldrich, T 4.840-2
- 2-Methyl-2-Sutanol (t-Amylalkohol), Sigma, A1685
- Antibody diluent with background reducing components, DAKO, S 3022
- BSA (bovine serum albumine), Sigma, A 8022
- DAB+ liquid chromogen solution (Diaminobenzidin), DAKO, K 3467
- DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium), Gibco, 41966-029
- Eosin, gelb, Merck KG aA, 2357423
- FCS (Foetal Calf Serum), Gibco, 10106-078
- Formaldehyd 35 %, Merck KG aA, 1.04001.2500
- goat anti-mouse immunoglobulins, DAKO, Z 0420
- HAMs F12, Biochrom KG, F0815
- HistoClear (Xylolersatz), Shandon, 9909309-W
- HistoMount (Xylolersatz-Eindeckmedium), Shandon, 9999122

- Instant Hämatoxylin, Shandon, 6765015
- PBS (Phosphate Buffered Saline) Dulbecco Instamed 9,55 g/l w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom KG, L 182-50
- Penicillin (50000 IU/ml), Boehringer, 1074440
- Streptomycin (50 mg/ml), Boehringer, 10744440
- Suprapur Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, Merck KG aA, 1.07209.0250
- Tissue Tek, Sakura O.C.T.™ Compound, (4583) 99 221
- Toluidinblau, Sigma, T3260
- Vectashield, Vector, H-1000

2.5.2 Zusammensetzung der Lösungen

Antigestagen und SERM

1 mg Antigestagen (Schering, ZK 230211) oder
 1 mg SERM (Schering, ZK 186619)
 gelöst in 110 µl Ethanol und 1000 µl Arachisöl.

Avertin

10 g 2,2,2 Tribromethanol in 10 ml Tert -Amylalkohol (2-Methyl-2-Butanol)

Moscona Lösung

4.0 g NaCl, 1.0 g Glucose, 0.5 g NaHCO₃, 0.15 g KCl, 0,025 g
 NaH₂PO₄·H₂O, 0.0125 g KH₂PO₄, 500 ml Aqua dest.

Nährmedium

- 500 ml Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
- 500 ml Ham's F12
 - 100 ml 10% FCS
 - Penicillin (100 IU/ml)
 - Streptomycin (100 µg/ml)

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation und Anheftungsrate der Endometriumfragmente in der Nacktmaus

3.1.1 Vergleich der Anheftungsrate von frei in die Bauchhöhle eingebrachten und fixierten Endometriumfragmenten

Die menschlichen Endometriumfragmente wurden wie unter 2.3.2 beschrieben in dem Bauchraum der Maus implantiert und bis zu 21 Tage kultiviert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Nacktmäuse mittels zervikaler Dislokation getötet, laparotomiert und die endometrialen Läsionen histologisch untersucht. Die frei in die Bauchhöhle eingebrachten Fragmente adherierten bereits 2 Tage nach der Transplantation an die verschiedenen Organe der Nacktmaus (Abb. 1A) und konnten in dem untersuchten Zeitraum bis zu 14 Tage makroskopisch identifiziert werden. Die Anzahl der identifizierten ektopen Endometriumfragmente sank jedoch bei einer Kulturdauer über 7 Tage. Während nach 4 Tagen noch 20 % der eingebrachten Fragmente lokalisiert werden konnten, fanden sich nach 14 Tagen nur 12,5 % wieder (Abb. 1A). Diese frei in die Bauchhöhle eingebrachten Fragmente lagerten sich bevorzugt am Darm (42,5%, Abb. 2a,b), an der Leber (32 %, Abb. 2b) und an der Bauchwand (10,7%) an, zu einem geringen Prozentsatz (7 %) konnten Fragmente im Fettgewebe der Bauchorgane lokalisiert werden. Häufigste Fehldiagnose bei der makroskopischen Bestimmung der Läsionen war die Verwechslung mit Aggregaten aus Lymphfollikeln, die vor allem am Darm endometrialen Läsionen glichen. Nur durch die histologische Auswertung konnten die endometrialen Läsionen daher eindeutig identifiziert werden.

Sehr viel einfacher war die Lokalisation der Endometriumfragmente, die mittels Nahtmaterial in der Peritonealhöhle am Darm, der Bauchwand und dem Mesenterialfett fixiert worden waren. Diese konnten nach 2 Tagen Kulturdauer zu 100 %, nach 21 Tagen zu 66 % wieder aufgefunden werden (Abb. 1B). Durch die histologische Analyse wurde bestätigt, dass es sich bei den entnommenen Gewebefragmenten um humanes Endometriumgewebe handelte. Bei den nicht

wieder aufgefundenen Fragmenten handelte es sich ausschließlich um solche, die an der Bauchwand fixiert worden waren.

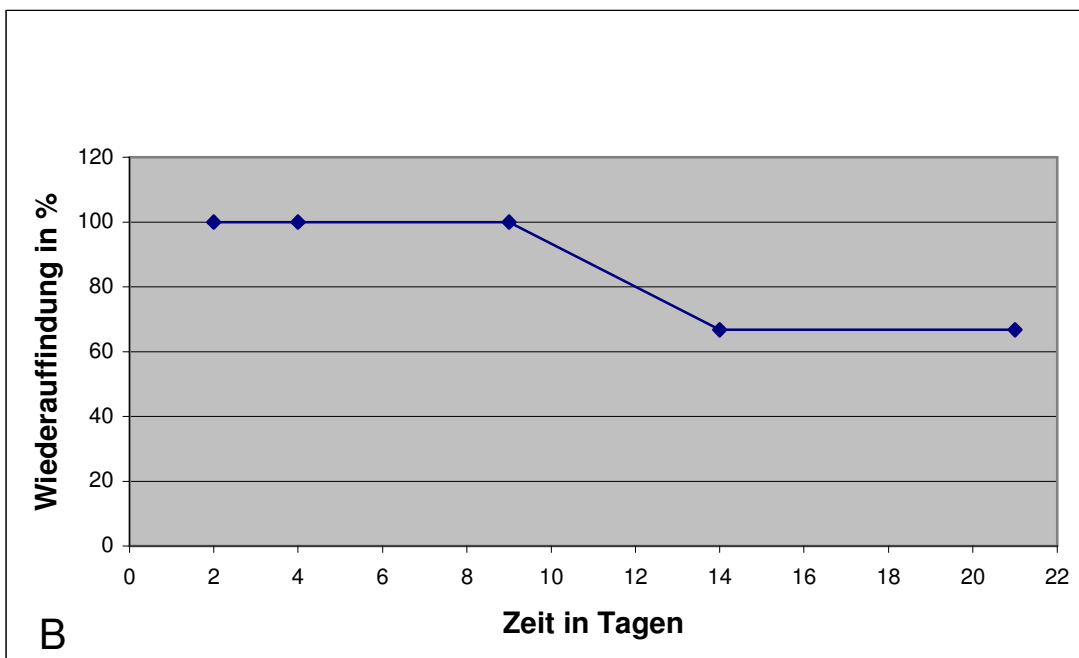
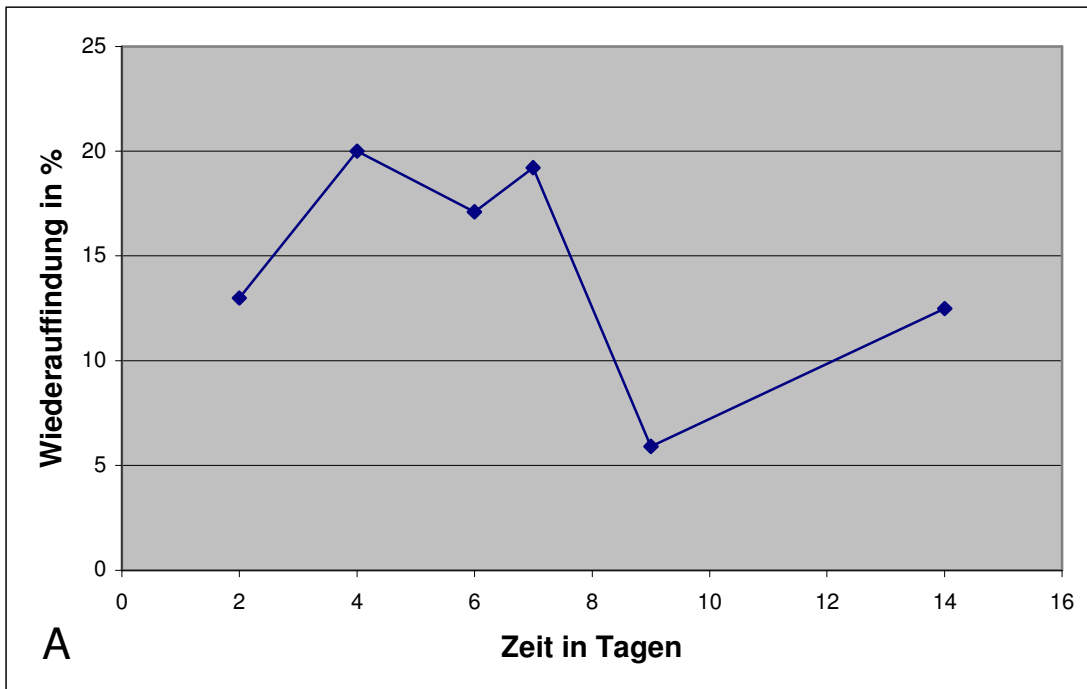


Abbildung 1:

A) Auffindungsrate der frei in die Bauchhöhle der Nacktmäuse eingebrachten Endometriumfragmente zu verschiedenen Zeitpunkten des Untersuchungszeitraumes.

B) Auffindungsrate der an Darm, Bauchwand und Mesenterialfett der Nacktmaus fixierten Endometriumfragmente zu verschiedenen Zeitpunkten des Untersuchungszeitraumes. 18

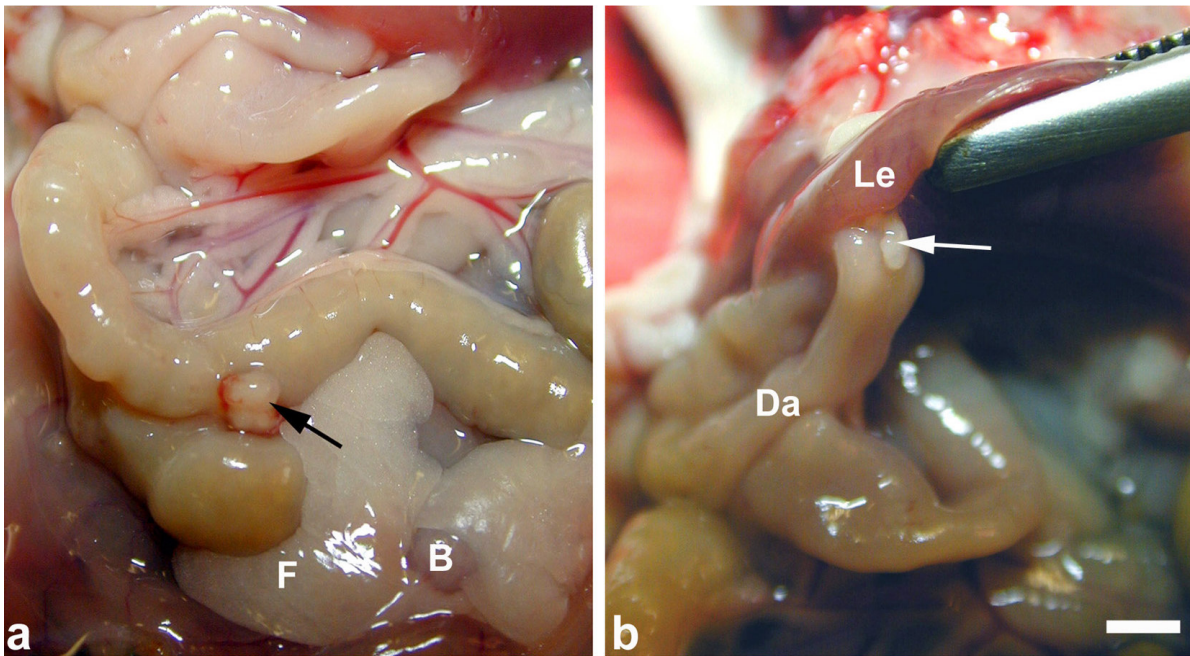


Abbildung 2:

Eröffneter Situs einer Nacktmaus mit angewachsenen Endometriumfragmenten (Pfeile).
 (a) Endometriumfragment (Pfeil) 7 Tage nach der Transplantation in die Nacktmaus. Das Fragment, welches frei in den Bauchraum der Nacktmaus eingebracht wurde, adherierte am Dünndarm der Nacktmaus.
 (b) humanes Endometriumfragment (Pfeil), welches sich nach 7 Tagen der Kultur in der Nacktmaus, sowohl an den Darm, als auch an die Leber der Nacktmaus anheftete. Beide Organe stellen typische Anheftungsstellen der Endometriumfragmente in der Nacktmaus dar.

B – Blase, Da – Darm, F – Fettgewebe, Le – Leber
 Balken = 350 µm

3.1.2 Vergleich der Anheftungsrate von Endometrium von Patientinnen mit und ohne Endometriose

Endometriumfragmente von Patientinnen mit Endometriose, sowie von Patientinnen ohne Endometriose wurden frei in die Bauchhöhle von Nacktmäusen eingebracht

(s. 2.3.2) und für 6- 7 Tage kultiviert. In bezug auf die Anheftungsrate der Endometriumfragmente zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

	Anzahl der Tiere	eingebrachte Fragmente (insgesamt)	identifizierte Endometriumherde (%)
Pat. mit Endometriose	4	37	18,9
Pat. ohne Endometriose	4	30	20

Table 1:

Die Tabelle zeigt den Anteil gefundener Endometriumfragmente an den insgesamt in die Versuchstiere eingebrachten Endometriumfragmente nach histologischer Aufarbeitung. Dabei erhielt eine Gruppe von Nacktmäusen Endometrium von Patientinnen mit Endometriose, die andere Gruppe erhielt Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose.

3.2 Morphologie des in der Nacktmaus kultivierten Endometriumgewebes

Das verwendete humane Endometrium stammte fast ausschließlich aus der Proliferationsphase des Menstruationszyklus (s. 2.1). Die Endometriumdrüsen waren teilweise gewunden und von einem dichten bis leicht aufgelockerten Stroma umgeben (Abb. 3a).

Nach der Transplantation in die Nacktmaus war die Morphologie der Drüsen bis zu Tag 9 sehr gut erhalten, unabhängig davon, ob die Fragmente frei in die Bauchhöhle eingebracht oder an den Organen fixiert wurden. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Drüsen englumig, mit Zylinderepithel ausgekleidet und mit zellreichem Stroma umgeben (Abb. 3b). Die Höhe des Drüsenepithels nahm zunehmender Kulturdauer ab. Obwohl auch nach 7 Tagen Kultivierung in der Nacktmaus die Morphologie der Endometriumfragmente weiterhin gut erhalten war (Abb. 3d, 3e), zeigte sich hier in einigen der Fragmenten isoprismatisches Drüsenepithel umgeben von zellarmen Endometriumstroma (Abb. 3e).

Einige der Drüsen begannen sich zystisch zu vergrößern, in diesen war das Drüsenepithel abgeflacht (Abb. 3f). Diese Veränderungen der Drüsenmorphologie setzten sich mit zunehmender Kulturdauer fort. Sie zeigte sich deutlicher nach 9 Tagen der Inkubation in der Nacktmaus (Abb. 3f) und setzte sich bis zum Ende des Versuchszeitraumes von 21 Tagen fort (Abb. 3g). Die zystische Erweiterung der Drüsenlumina weist auf eine persistierende sekretorische Aktivität der Drüsenepithelien bei fehlender Abflussmöglichkeit hin. Generell konnte beobachtet werden, dass alle transplantierten humanen Fragmente mit dem Stromaanteil an die verschiedenen Organe der Nacktmaus adherierten. In keinem Fall befanden sich luminales oder Drüsenepithel des Endometriumgewebes in direktem Kontakt zu dem Wirtsgewebe (Abb. 3d-g). An den freien Oberflächen der Fragmente konnte ein einschichtiges bedeckendes Epithel ab dem 2. Tag der Inkubation in der Nacktmaus nachgewiesen werden (Abb. 3f).

Ab dem 2. Tag der Kultur der Endometriumfragmente in der Nacktmaus waren mäßig viele Lymphozyten im Bereich der Anheftungsstelle der Fragmente zu beobachten. Eine stärkere Einwanderung von Lymphozyten in die Fragmente konnte in der Folgezeit der Inkubation in der Nacktmaus nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen frei in die Peritonealhöhle der Nacktmaus eingebrachten und mit Nahtmaterial fixierten Fragmenten. Bei den

fixierten Fragmenten zeigten sich im Bereich der Nahtstelle über den gesamten Beobachtungszeitraum vereinzelte Lymphozyten.

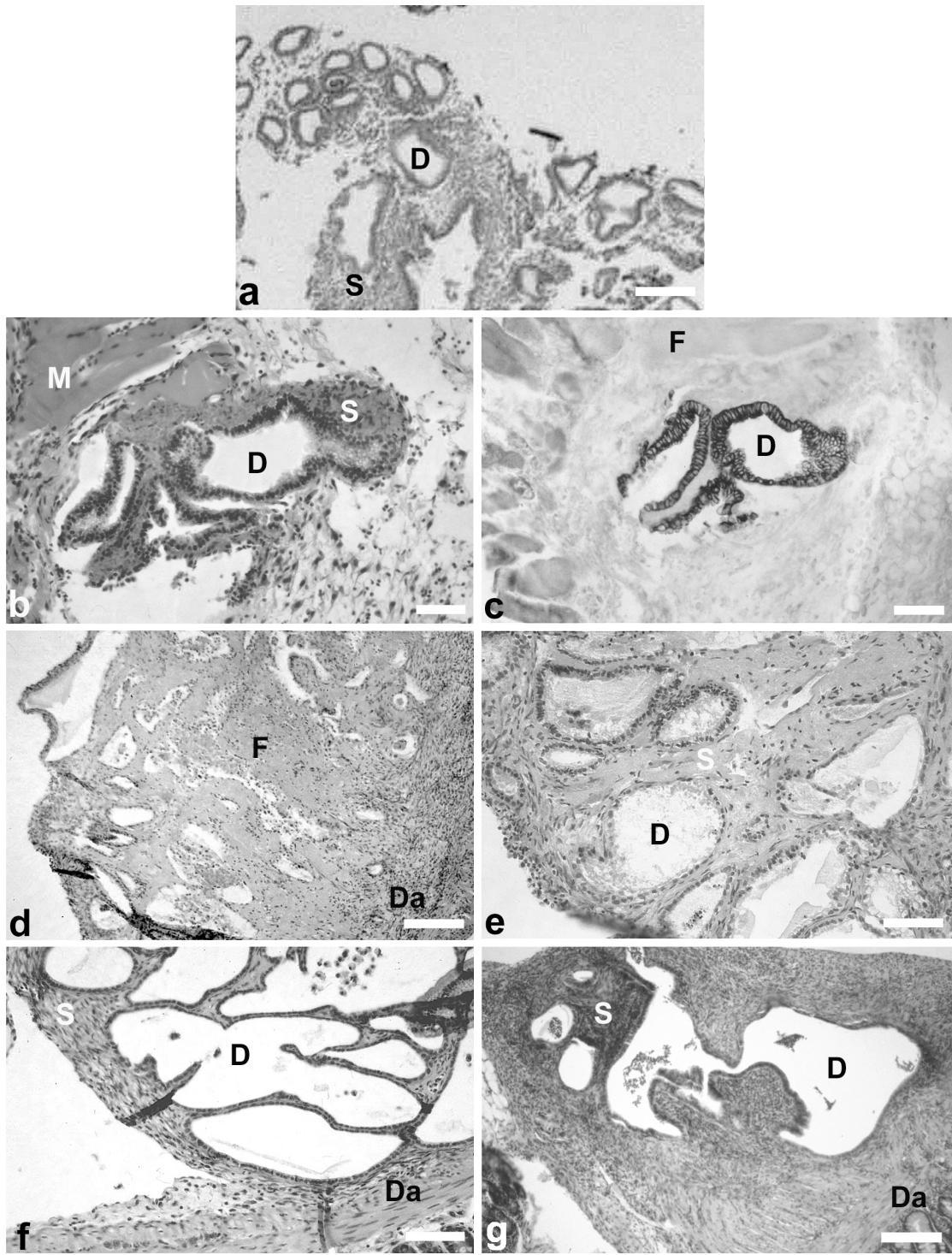


Abbildung 3

Abbildung 3: Histologie von nativen (a), sowie von 2-21 Tage in der Nacktmaus kultivierten Endometriumfragmenten (b-h)

- a) natives Endometriumgewebe aus der späten Proliferationsphase des Menstruationszyklus vor Transplantation in die Nacktmaus mit Endometriumstroma und Endometriumdrüsen.
- b) Endometriumfragment fixiert an das Mesenterialfett der Nacktmaus nach 2 Tagen Inkubation. Die Drüsen sind englumig, das Drüsenepithel hochprismatisch und geordnet. Das Drüsenstroma adheriert an die Muskulatur der Bauchwand der Nacktmaus, sowie umgebendes Fettgewebe. Das fixierende Nahtmaterial ist nicht mit angeschnitten.
- c) Endometriumfragment fixiert an das Mesenterialfett der Nacktmaus nach 2 Tagen der Inkubation in der Nacktmaus nach einer Cytokeratin Färbung (s. 3.3). Die Drüsen sind mit Zylinderepithel ausgekleidet, das Drüsenepithel exprimiert Cytokeratin. Die Drüsen sind englumig und von zellreichem Stroma umgeben, welches an die Muskulatur und das Fettgewebe der Nacktmaus adheriert. Weder das Drüsenstroma des humanen Endometriumfragmentes noch das Wirtsgewebe weisen eine Expression von Cytokeratin auf.
- d) Endometriumfragment am Darm der Nacktmaus am 7. Tag nach der Transplantation des frei in die Bauchhöhle der Nacktmaus eingebrachten Endometriums. Das Endometriumfragment adheriert mit seinem Stromaanteil an das Wirtsgewebe. Einige Drüsenanteile des humanen Fragmentes zeigen isoprismatisches, andere hochprismatisches Epithel.
- e) Endometriumdrüsen mit iso- bis hochprismatischem Drüsenepithel und umgebenden Stroma 7 Tage nach der Transplantation in die Nacktmaus.
- f) Am Darm der Nacktmaus adheriertes Endometriumfragment 9 Tage nach der Transplantation. Die Drüsen sind von einem Stromasaum umgeben, der an den Darm der Nacktmaus adheriert. Die Endometriumdrüsen sind zystisch vergrößert. Das Drüsenepithel abgeflacht. Eine einschichtige Epithelschicht bedeckt die Oberfläche des Fragmentes, welche nicht an das Wirtsgewebe adheriert.
- g) An den Darm der Nacktmaus adheriertes Endometriumfragment mit zystisch erweiterten Drüsen nach 21 Tagen der Inkubation in der Nacktmaus. Die Drüsen sind von Stroma umgeben, das an den Darm der Nacktmaus adheriert.

D – Endometriumdrüse, Da– Darm, F – Endometriumfragment, M – Muskulatur,
S – Endometriumstroma

Balken: a, d = 150 µm, b, c = 60 µm, e, f, g = 100 µm

3.3 Histologische Charakterisierung der humanen Endometriumfragmente durch zellbiologische Differenzierungsmarker

3.3.1 Cytokeratin und Vimentin

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, zeigten die humanen Endometriumfragmente eine gut erhaltene Morphologie in dem beobachteten Zeitraum von 21 Tagen. Zur Charakterisierung des zellbiologischen Differenzierungsstatus wurde die Expression von Cytokeratin und Vimentin in dem in der Nacktmaus kultivierten Endometrium untersucht. Das Drüsenepithel der Endometriumfragmente nach 2 Tagen der Inkubation in der Nacktmaus wurde deutlich mit einem anti-humanen Cytokeratin Antikörper angefärbt. Die Endometriumdrüsen exprimierten Cytokeratin und waren gut vom Cytokeratin negativen Endometriumstroma zu differenzieren (Abb. 3c, Abb. 4a, b). Gewebe murinen Ursprungs wurde nicht mit angefärbt. Diese Expression von Cytokeratin blieb in den Drüsenepithelien der Endometriumfragmente auch nach längerer Kultur erhalten. Die nach 14 Tagen beobachteten zystisch erweiterten Drüsen mit abgeflachtem Drüsenepithel (Abb. 4c) zeigten weiterhin eine deutliche Cytokeratinexpression (Abb. 4d). Diese Expression von Cytokeratin war unabhängig von der Lokalisation der humanen Endometrien in der Peritonealhöhle der Nacktmaus (Abb. 3b, c, Abb. 4a, b).

Vimentin ist ein charakteristischer zellbiologischer Marker für Bindegewebszellen, der das Stroma der humanen Endometriumfragmente deutlich anfärbte. Epithelzellen wurden durch Vimentin nicht angefärbt (Abb. 4e). Auch hier zeigte sich keine Kreuzreaktion mit dem Gewebe der Nacktmaus.

Veränderungen in der Expression der Differenzierungsmarker waren jedoch in Fragmenten zu erkennen, die mehr als 9 Tage in der Nacktmaus kultiviert wurden. In den Bereichen mit zellreichem Stroma, das sich deutlich durch anti-Vimentin-Antikörper anfärben ließ, zeigte das Drüsenepithel auch nach längerer Kulturdauer keine Vimentin- Expression (Abb. 4f). Nach einer Kulturdauer von 14 Tagen waren in den Endometriumfragmenten jedoch Stromabereiche zu erkennen, die weitgehend zellfrei waren und daher keine Vimentinfärbung zeigten. Interessanterweise exprimierten Drüsenepithelien, die an ein solches zellfreies Stroma angrenzten, zusätzlich zu Cytokeratin auch deutlich Vimentin (Abb. 4g).

Diese Ergebnisse weisen auf Dedifferenzierungsvorgänge in den humanen Endometriumfragmenten hin, die ab einer Kulturdauer von 9 Tagen bei einigen Endometriumfragmenten zu beobachten waren.

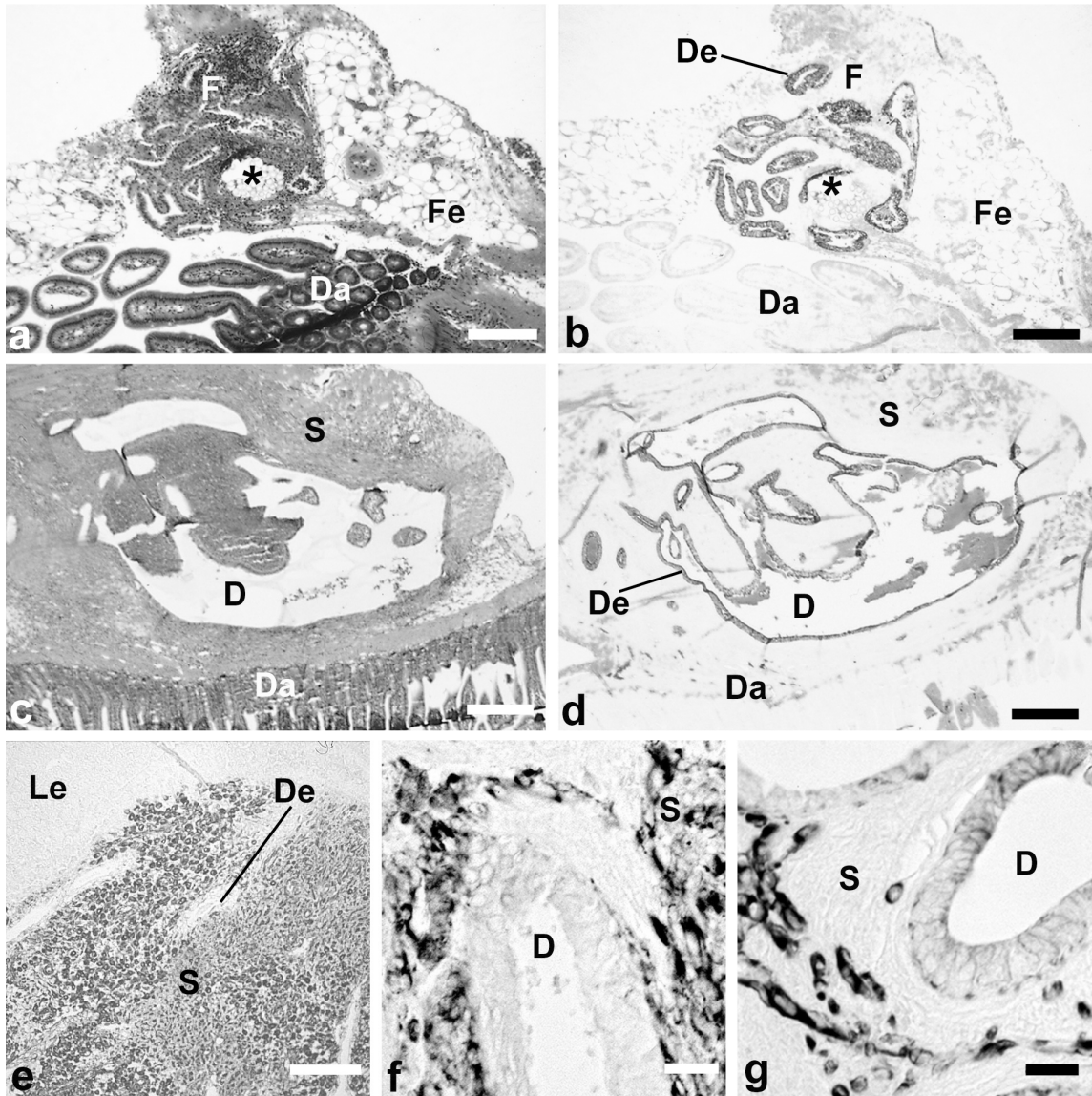


Abbildung 4

Abbildung 4: Histologische Charakterisierung von in der Nacktmaus gewachsenen Endometriumfragmenten durch die Differenzierungsmarker Cytokeratin (a-d) und Vimentin (e-g)

- a, b) An den Darm der Nacktmaus fixiertes Endometriumfragment 2 Tage nach Transplantation, HE- Färbung (a). Das Endometriumfragment adheriert mit seinem Stromaanteil an den Darm und das umgebende Fettgewebe. Im rechten unteren Quadranten des Fragmentes (Mitte der Abbildung) quer angeschnittenes Nahtmaterial. b) Die humanen endometrialen Drüsenepithelien zeigen eine deutliche Expression von Cytokeratin, während das Mausegewebe, sowie das Stroma des humanen Fragmentes keine Kreuzreaktion zeigen und auch nicht angefärbt werden.
- c, d) An den Darm der Nacktmaus adheriertes Endometriumfragment 14 Tage nach der Transplantation, HE- Färbung (c). Das endometriale Drüsenepithel zeigt auch nach 14 Tagen Kultur in der Nacktmaus eine deutliche Cytokeratin- Expression, wobei weder das Gewebe der Nacktmaus, noch der Stromaanteil des humanen Fragmentes eine Kreuzreaktion zeigen und nicht angefärbt sind (d).
- e) Endometriumfragment 2 Tage nach der Transplantation, angewachsen an die Leber. Nur die endometrialen Stromazellen exprimieren Vimentin nicht aber humanen die Drüsenepithelien. Auch die Leberzellen der Nacktmaus zeigen keine Kreuzreaktion.
- f, g) Endometriumfragment 14 Tage nach der Transplantation, immunhistochemische Färbung mit Vimentin. Bei Expression von Vimentin im angrenzenden Stroma zeigen die Drüsenepithelien keine Färbung für diesen Differenzierungsmarker (f). Ist das angrenzende Stroma zellarm (keine Vimentinfärbung sichtbar), so exprimiert das Drüsenepithel Vimentin (g).

D – Endometriumdrüse, Da – Darm, De - Drüsenepithel F – Endometriumfragment,
Fe - Fettgewebe, Le - Leber, S – Endometriumstroma, ● - Nahtmaterial

Balken: a, b = 150 µm, c, d = 100 µm, e = 150 µm, f, g = 10 µm

3.3.2 E- Cadherin

Wie auch bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte (Inoue et al. 1992), exprimierte auch in der vorliegenden Arbeit das native Endometrium vor der Kultivierung in der Nacktmaus E- Cadherin in den Zellmembranen der Drüsenepithelien (Abb. 5a). Diese Expression von E- Cadherin blieb in den endometrialen Drüsen während der Kultivierung der Endometriumfragmente in der Nacktmaus über einen Zeitraum von 7 Tagen (Abb. 5b) sowie auch 14 Tagen (Abb. 5c) erhalten.

3.3.3 Connexin 26 und Connexin 43

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass humanes Endometrium eine Expression des Gap-Junction Proteins Connexin 26 im luminalen sowie im Drüsenepithel zeigt und eine Expression von Connexin 43 im Stroma (Jahn et al. 1995). Dies konnte hier auch für das native Endometrium vor der Kultur in der Nacktmaus bestätigt werden.

Das native Endometrium zeigte eine starke Färbung für Connexin 26 in den Drüsenepithelien (Abb. 5d) sowie von Connexin 43 im angrenzenden Stroma (Abb. 5f). Diese Expression des Connexin 26 persistierte im Drüsenepithel der Endometriumfragmente über einen Kulturzeitraum von 14 Tagen in der Nacktmaus (Abb. 5e). Ebenso konnte die Expression von Connexin 43 über einen Kulturzeitraum von 4 Tagen (Abb. 5g) und 9 Tagen (Abb. 5h) im Drüsenstroma der Endometriumfragmente nachgewiesen werden.

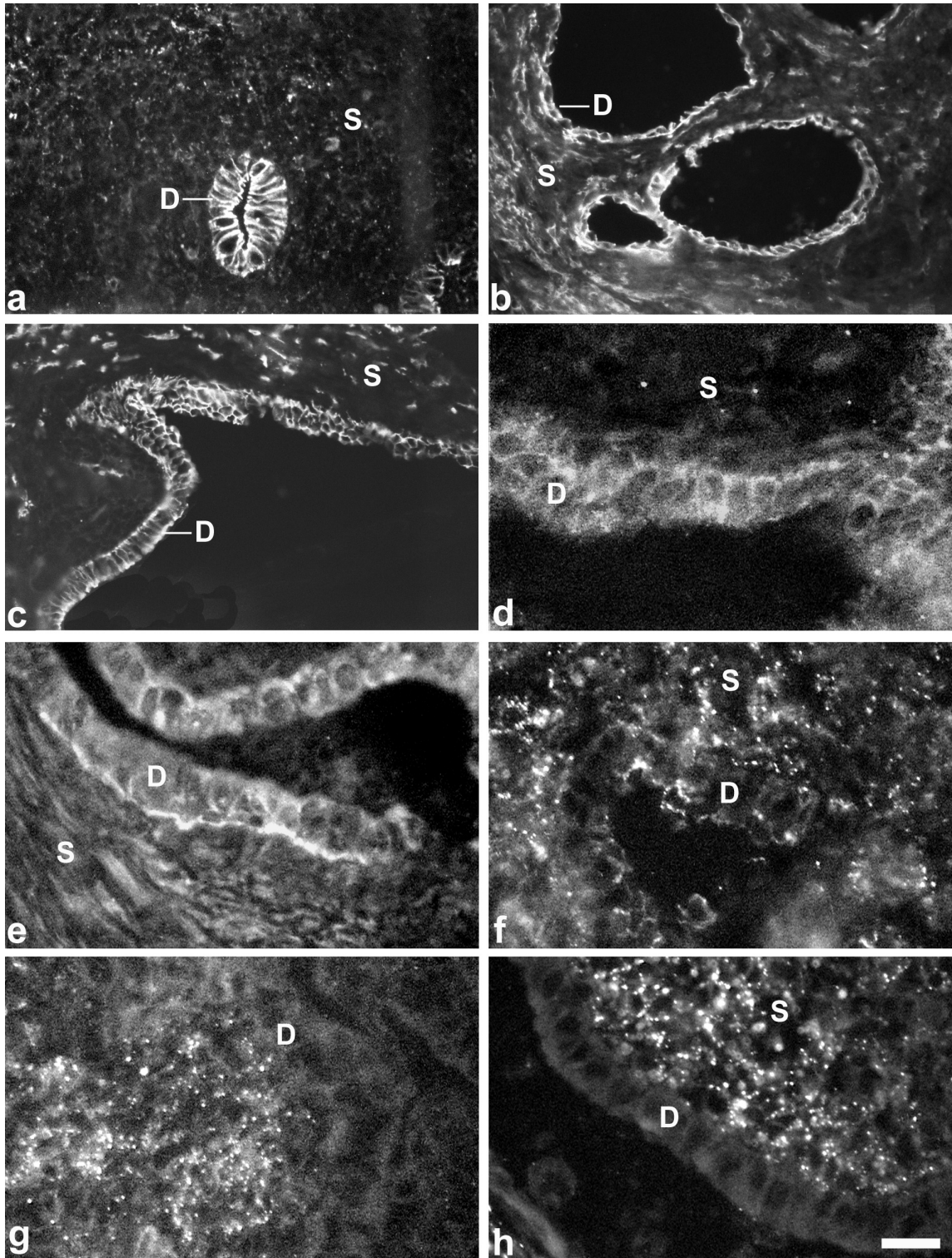


Abbildung 5

Abbildung 5: Expression von E- Cadherin, Connexin 26 und Connexin 43 in nativem Endometrium sowie in der Nacktmaus kultivierten Endometriumfragmenten

a-c: Expression von E-Cadherin

Das endometriale Drüsenepithel des Ausgangsgewebes zeigt eine deutliche Expression von E- Cadherin (a). Die Expression von E- Cadherin bleibt im endometrialen Drüsenepithel 7 Tage (b), sowie 14 Tage (c) nach der Inkubation in der Nacktmaus erhalten.

d, e: Expression von Connexin 26

Die Expression des Cx 26- Proteins ist in den Drüsen des Ausgangsgewebes (d), sowie auch nach 14 Tagen der Inkubation in der Nacktmaus (e) deutlich zu erkennen.

f-h: Expression von Connexin 43

Die Expression des Cx 43- Proteins zeigt sich in den endometrialen Stromazellen sowohl im nativen Endometriumgewebe (f) als auch 4 Tage (g), sowie 9 Tage (h) nach der Transplantation in die Nacktmaus.

D – Endometriumdrüse, S – Endometriumstroma

Balken: a = 30 μm , b= 100 μm , c=20 μm , d, f, g= 15 μm , e, h= 10 μm

3.3.4 Angiogenese in den in der Nacktmaus kultivierten Endometriumfragmenten

Zum Nachweis der Gefäßeinsprossung von der Nacktmaus in die transplantierten humanen Endometriumfragmente wurden Fragmente, die 2-14 Tage in der Nacktmaus kultiviert worden waren, mit einem gegen Endothel murinen Ursprungs gerichteten Antikörper (Maus- Panendothelialer Antikörper) inkubiert. Zwei Tage nach Transplantation konnte noch keine Gefäßeinsprossung in das Endometriumgewebe beobachtet werden (Abb. 6a), während nach 4 Tagen eine deutliche Färbung von Endothelien murinen Ursprungs in den Fragmenten sichtbar war, welche von der Adhäsionsstelle der Fragmente am Wirtsgewebe ausging. Diese Endothelinsprossung in die humanen Endometriumfragmente konnte sowohl in den an die Leber (Abb. 6b) als auch in den am Darm (Abb. 6d) und am Mesenterialfett (Abb. 6c) angewachsenen Fragmenten beobachtet werden. Das Ausmaß der Angiogenese nahm mit zunehmender Kulturdauer zu. Bereits nach 9 Tagen Kulturdauer in der Nacktmaus waren die humanen Fragmente durchsetzt von Endothel der Nacktmaus (Abb. 6e). In der Ausdehnung und zeitlichen Progression der Gefäßneubildung zeigte sich kein Unterschied zwischen Fragmenten, die im Bauchraum fixiert wurden zu denen, die frei in den Bauchraum der Nacktmaus eingebracht worden waren.

Zur Untersuchung, ob die der humanen Gefäße innerhalb der Endometriumfragmente persistieren oder degenerieren, wurden diese mit gegen humanen von-Willebrand- Faktor gerichteten Antikörper inkubiert. Vor der Transplantation in die Nacktmaus waren die Endometriumfragmente von Endothel humanen Ursprunges durchsetzt (Abb. 6f). Die Expression von von-Willebrand- Faktor konnte auch zwei Tage nach der Transplantation noch in den humanen Endometriumfragmenten nachgewiesen werden (Abb. 6g). Nach 14 Tagen der Kultivierung in der Nacktmaus konnten jedoch keine von- Willebrand- Faktor exprimierenden humanen Endothelien mehr in den Endometriumfragmenten nachgewiesen werden (Abb. 6h). Mit zunehmender Länge der Kultivierung der humanen Endometriumfragmente in der Nacktmaus nahm die Nachweisbarkeit von humanem von- Willebrand- Faktor in den Endometriumfragmenten somit ab. Es kam hier offensichtlich zu einer Dedifferenzierung der humanen Gefäße, die keinen Anschluss an das Gefäßsystem der Maus fanden.

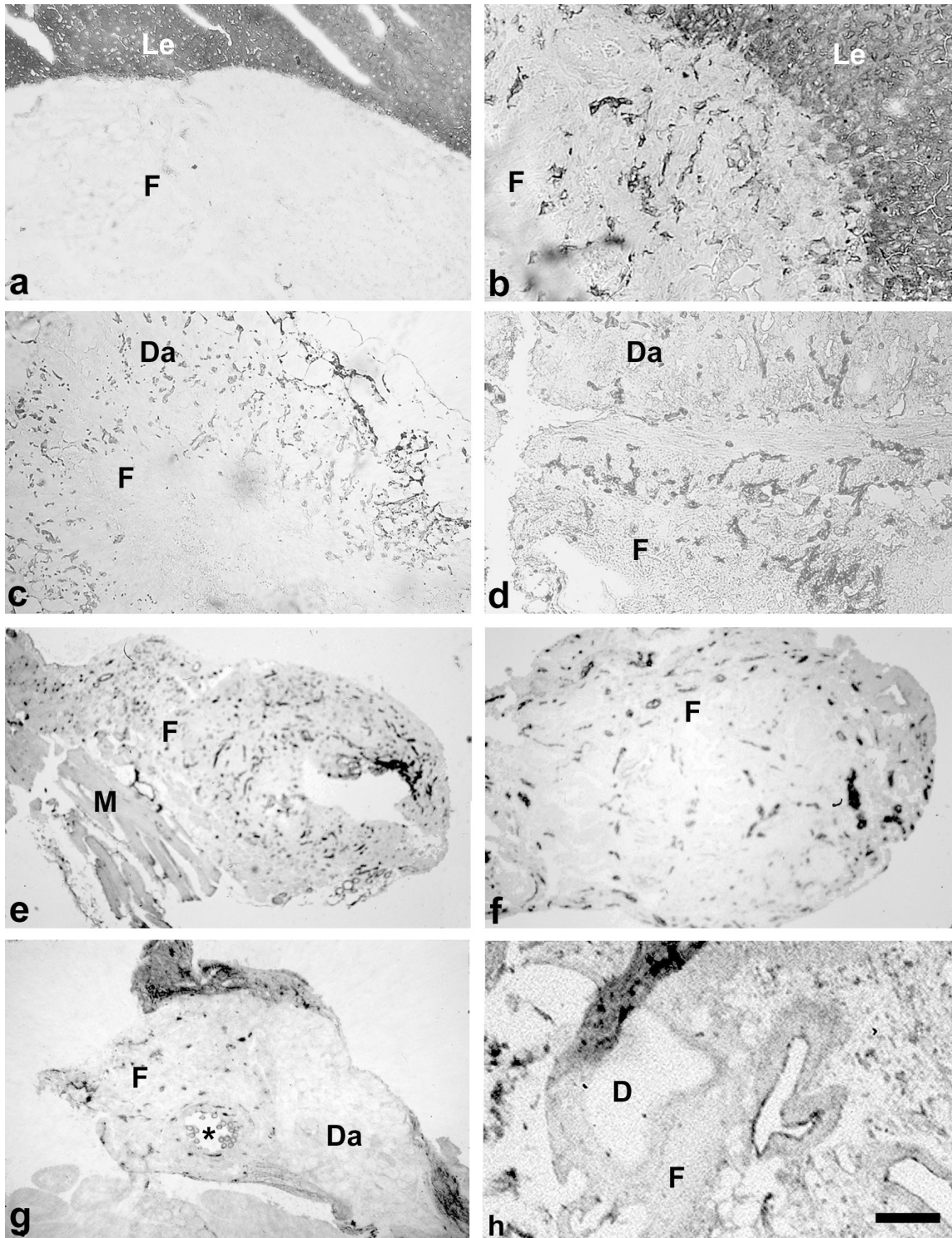


Abbildung 6

Abbildung 6: Angiogenese in den endometrialen Läsionen

- a- e) Immunhistochemische Färbung der Mausendothelien mit einem Panendothelialen Antikörper. Während 2 Tage nach der Transplantation in die Nacktmaus noch keine einsprossenden Endothelien in die adherierten Endometriumfragmente sichtbar waren (a), zeigten sich 4 Tage nach der Transplantation sowohl in an die Leber (b), als auch in an das Fettgewebe (c) und den Darm (d) adherierten Endometriumfragmenten zahlreiche eingesprossete Mausendothelien. Nach 9 Tagen der Kultur in der Nacktmaus waren die gesamten Endometriumfragmente von Mausgefäßen durchsetzt (e).
- f – h) Immunhistochemische Färbung der endometrialen Gefäße mit Anti- von-Willebrand- Faktor. Während die humanen endometrialen Endothelien im Ausgangsgewebe (f) sowie nach 2 Tagen der Kultur in der Nacktmaus (g) eine deutliche Färbung mit von-Willebrand Faktor zeigen, ist diese Expression 14 Tage nach der Transplantation in die Nacktmaus kaum noch detektierbar (h).

D – Endometriumdrüse, Da– Darm, F – Endometriumfragment, Le – Leber,
M – Muskulatur, • - Nahtmaterial

Balken: a - d, f, g = 150 µm, e, h = 100 µm

3.4 Lokalisation, Morphologie und Angiogenese der Endometriumfragmente nach Behandlung der Nacktmäuse mit SERM bzw. Antigestagen

3.4.1 Lokalisation

Zur Untersuchung des Einflusses von selektiven Östrogenrezeptor Modulatoren (SERMs) oder Progesteronantagonisten wurden humane Endometriumfragmente 6 Tage in Nacktmäusen kultiviert, die entweder mit einem SERM oder einem Antigestagen der Firma Schering behandelt wurden (s. 2.3.3).

In einer Versuchsgruppe erhielten die Nacktmäuse sowohl frei im Bauchraum platzierte, als auch fixierte Fragmente. Von den fixierten Fragmenten konnten bis zu 100 % der Fragmente an den Fixationsstellen (Bauchwand, Darm, Mesenterialfett) wieder aufgefunden werden. Von den frei in den Bauchraum eingebrachten Fragmenten konnten in den mit SERM behandelten Tieren 50 % der eingebrachten Endometriumfragmente identifiziert werden, die sich vor allem an der Leber anhefteten. In den mit Progesteronantagonisten behandelten Tieren konnte keines der frei eingebrachten Fragmente wieder aufgefunden werden. Bei den Tieren der Kontrollgruppe konnten 16,6 % der Fragmente identifiziert werden. Eine andere Versuchsgruppe erhielt nur frei in den Bauchraum der Nacktmäuse eingebrachte Fragmente. In dem mit SERM behandelten Tier konnten 15,4 % der Fragmente histologisch identifiziert werden. In dem mit Antiprogesteron behandelten Tier fanden sich 30,8 % der Fragmente, die sich vor allem an der Leber anhefteten, wieder. In der Kontrolle wurden 15,4 % der Fragmente histologisch identifiziert, ausschließlich an der Leber.

3.4.2 Morphologie

Die in mit einem Progesteronantagonisten behandelten Nacktmäusen kultivierten Endometriumfragmente zeigten im untersuchten Zeitraum von 6 Tagen keine morphologischen Unterschiede zur Kontrolle. Die gut erhaltenen Drüsenepithelien waren englumig und mit Zylinderepithel ausgekleidet, das Stroma war zellreich und adherierte an das Wirtsgewebe (Abb. 7a). Im Gegensatz dazu zeigten sich in den Fragmenten morphologische Veränderungen, die für 6 Tage in den mit SERM behandelten Nacktmäusen kultiviert worden waren. Die endometrialen Drüsen

waren in einigen Fällen zystisch erweitert (Abb. 7b), das Drüsenepithel war z.T. aufgelockert und ungleichmäßig (Abb. 7c). Während das endometriale Stroma in den meisten behandelten Fragmenten wie auch in den Kontrollen zellreich war (Abb. 7b), erschien es in einigen mit SERM behandelten Fragmenten zellarm und ödematös (Abb. 7c).

3.4.3 Angiogenese

Der Nachweis muriner Endothelien zeigte keinen Unterschied in der zeitlichen Progression und der Ausdehnung der Angiogenese in den humanen Endometriumfragmenten, die in den Kontrolltieren (Abb. 7d), in den mit SERM (ohne Abb.) oder mit Antigestagen (Abb. 7e) behandelten Nacktmäusen kultiviert worden waren.

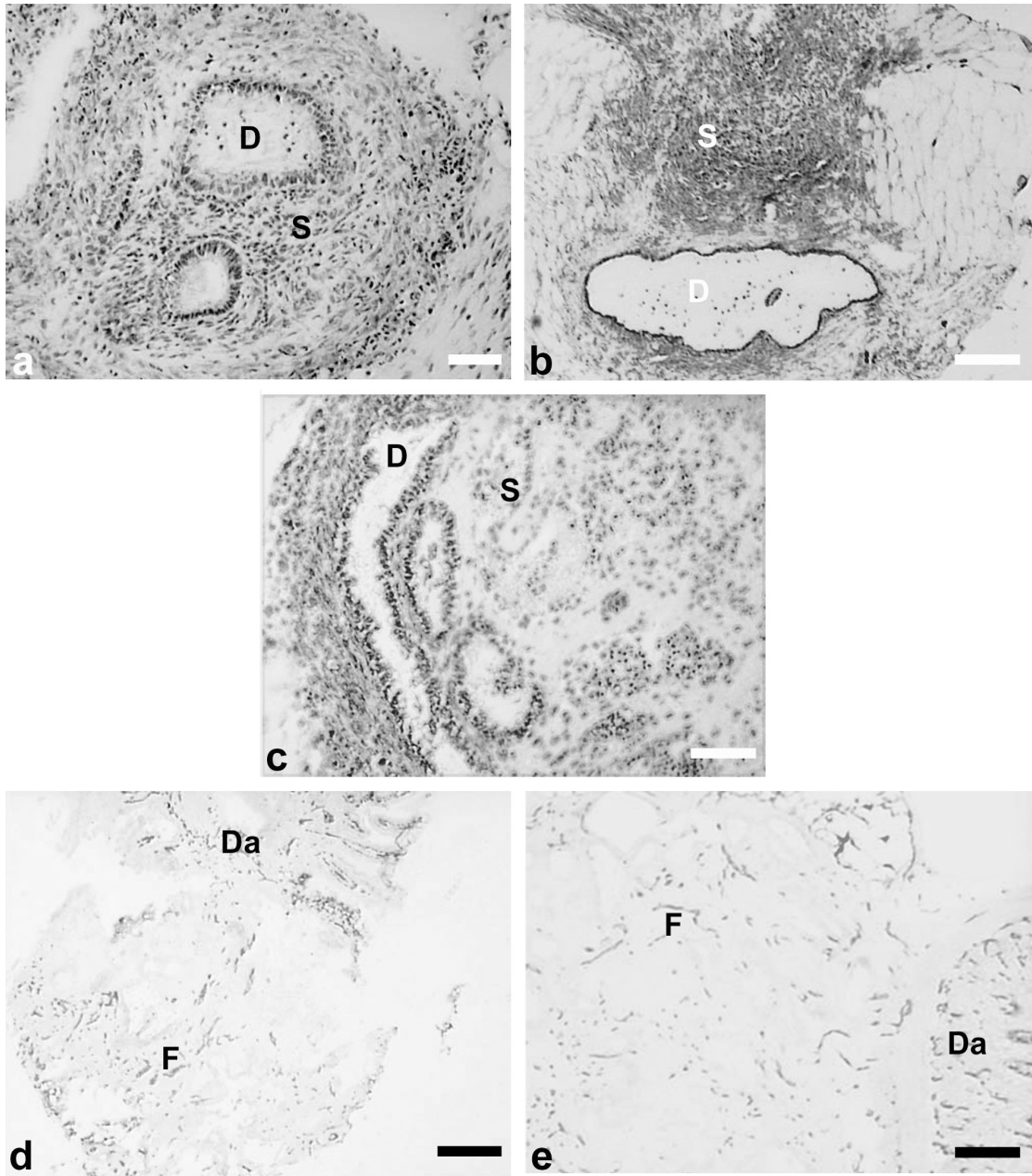


Abbildung 7

Abbildung 7: Charakterisierung der Endometriumfragmente nach 6 Tagen Inkubation in mit SERM oder mit Antigestagen behandelten Nacktmäusen

- a-c) Histologie der Endometriumfragmente (Toluidinfärbung).
- a) Endometriumfragment mit gut erhaltenen Endometriumdrüsen nach Kultur in mit einem Progesteronantagonisten behandelten Nacktmäusen.
- b) Zystische Erweiterung einer Endometriumdrüse nach Behandlung mit SERM.
- c) Aufgelockerte Struktur des Drüsenepithels nach Behandlung mit SERM.

- d , e) Immunhistochemische Darstellung der Gefäßeinsprossung mittels Pan Antikörper. Es zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß und Muster der Angiogenese beim Vergleich von in Kontrolltieren ohne Behandlung gewachsenen Endometriumfragmenten (d) zu, den in mit Antigestagen behandelten Tieren kultivierten Fragmenten (e).

D – Endometriumdrüse, Da– Darm, F – Endometriumfragment,
S – Endometriumstroma

Balken: a, c = 60 μm , b, d, e = 100 μm

4 Diskussion

Trotz der weiten Verbreitung der Endometriose in der weiblichen Bevölkerung ist die Pathogenese dieser Krankheit nach wie vor unverstanden. Da diese Krankheit jedoch nur bei Primaten auftritt, fehlen geeignete Tiermodelle für ihre Untersuchung. Zur Aufklärung zellbiologischer Mechanismen, die zu dieser Krankheit führen, wurde daher zunehmend die Nacktmaus als Tiermodell eingesetzt (Zamah et al. 1984, Bergqvist et al. 1985, Bruner et al. 1997, Nisolle et al. 2000 a, b, Balczyk 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden Fragmente von humanem Endometrium in der Nacktmaus kultiviert. Dieses Model wurde durch den Einsatz von Differenzierungsmarkern sowie der Analyse der Angiogenese validiert, um seine Anwendbarkeit für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapiekonzepte der Endometriose zu untersuchen.

4.1 Anheftung und Lokalisation der Endometriumfragmente

Die humanen Endometriumfragmente wurden bis zu 21 Tage in der Nacktmaus kultiviert. Nach einem Untersuchungszeitraum von 6-7 Tagen konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob Endometrium von Patientinnen mit Endometriose eine stärkere Tendenz zur Implantation hat, als Endometrium von Patientinnen ohne Endometriose. Insgesamt konnten von den frei in den Bauchraum der Nacktmaus eingebrachten Fragmenten je nach Dauer der Kultivierung bis zu 20 % wieder aufgefunden werden.

Wie auch schon von Nisolle et al. (2000 b) gezeigt werden konnte, führte auch in der vorliegenden Arbeit das freie Einbringen von Endometriumfragmenten in die Bauchhöhle der Nacktmaus zu einer hohen Verlustrate. Eine Erklärung hierfür könnte in dem teilweise erhaltenen Abwehrsystem der Nacktmaus liegen, da sowohl die B- Lymphozyten als auch die Natural Killer Zellen weiter aktiv waren. Ebenso ist es möglich, dass ein Teil der Fragmente nicht zur Anheftung kam und in der Bauchhöhle der Nacktmaus frei flotierend bei der Sektion nicht wieder auffindbar war. Von Tabibzadeh et al. (1999) wurde die Anheftung von freien Endometriumfragmenten an der Skelettmuskulatur und im Fett der Bauchorgane beschrieben.

Zamah et al. (1984) fanden eine Anheftung der Fragmente am kaudalen Bauchfett und dem Mesenterium. In der vorliegenden Arbeit hefteten sich die Endometriumfragmente überwiegend an den Darm und an die Leber der Nacktmaus an. In geringerem Maße fanden sich auch Endometriumfragmente an der Bauchwand und am Fettgewebe der Bauchorgane. Diese Lokalisationen im tierexperimentellen Modell sind abweichend von denen der Endometrioseherde im Menschen, die sich bevorzugt an den Eierstöcken, im Douglas Raum, auf dem Blasendach und in den Ligamenti uteri befinden (Schweppe 1984). Leber oder Darm als Lokalisation der Endometriose beim Menschen wurden dagegen selten beschrieben (Jenkins et al. 1986). Die unterschiedliche Verteilung der Herde beruht auf dem aufrechten Gang des Menschen. Bei den Nacktmäusen hingegen, die sich im Vierfüßlergang fortbewegen und nach der Operation im Käfig frei beweglich waren, sind als tiefste Punkte die Bauchwand und die verschiedenen Anteile des Darmes anzusehen. Zusätzlich konnten Darmbewegungen und der intraabdominelle Druck freie Fragmente bis unter die Leber transportieren und sie dort anheften lassen. Die an der Bauchwand gefundenen Fragmente lagen meist im Bereich der Laparotomienarbe, so dass das bereits von Tabibzadeh et al. (1999) beschriebene Ergebnis, dass ein Trauma ein Faktor ist, der die Anheftung von Endometriumfragmente fördert, hier bestätigt wurde.

Die Kultivierung frei in die Bauchhöhle der Nacktmaus eingebrachter Endometrium-fragmente zeigte, dass intaktes Peritoneum nicht vor der Anheftung von Endometrium schützt. Van der Linden et al. (1996) vermuteten in einem in vitro Versuch, dass ein intaktes Peritoneum als schützende Barriere Endometrium von der Implantation abhält. Die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse unterstützen dagegen die Versuchsergebnisse von Nisolle et al. (2000 a), die eine Anheftung an das intakte Peritoneum der Nacktmaus nachwiesen.

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits versucht, die Wiederauffindungsrate der endometrialen Läsionen in der Nacktmaus zu erhöhen, so verwendeten Tabibzadeh et al. (1999) fluoreszenzmarkierte Einzellzellsuspensionen zur besseren Lokalisation der in die Bauchhöhle der Nacktmaus eingebrachten Endometriumzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen Endometriumsfragmente mit Nahtmaterial an der seitlichen Bauchwand, dem Mesenterialfett und am Darm

fixiert. Die fixierten Fragmente waren im Gegensatz zu den frei in die Bauchhöhle eingebrachten Endometriumgewebe in bis zu 100 % der Fälle wieder auffindbar.

Die Fixierung der Fragmente bietet somit zum einen den Vorteil einer hohen Wiederauffindungsrate, zum anderen können die Fragmente mit dieser Methode gezielt an bestimmte peritoneale Lokalisationen positioniert werden.

Aus welchem Grund in einzelnen Fällen die an der Bauchwand fixierten Fragmente nicht wieder aufgefunden werden konnten, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

4.2 Morphologie der Endometriumfragmente

Die in der Peritonealhöhle der Nacktmaus kultivierten Endometriumsfragmente zeigten während der gesamten Kulturdauer von 21 Tagen eine gut erhaltene Morphologie, unabhängig davon, ob sie fixiert oder frei in die Bauchhöhle eingebracht wurden.

Vor allem ab Tag 9 der Kultivierung zeigten sich zum Teil zystische Erweiterungen der endometrialen Drüsen. Nisolle et al. (2000 b) stellten bei ihren Versuchen mit Endometrium aus der Menstruationsphase bereits am 5. Tag der Kultur in der Nacktmaus eine zystische Vergrößerung der Drüsen fest. In einer früheren Versuchsreihe hingegen, bei der zusätzlich Endometrium aus der Proliferations- und Sekretionsphase eingesetzt wurde, konnten diese Veränderung erst nach einer Kultivierungsdauer von 3 Wochen gezeigt werden (Nisolle et al. 2000 a). Die zystische Vergrößerung der Drüsen könnte zum einen vom physiologischen Zustand des humanen Ausgangsgewebes abhängig sein (Nisolle et al. 2000 a, b), zum anderen könnte sie durch die fehlende Abflussmöglichkeit für die weiterhin sekretorisch produktiven Endometriumdrüsen erklärt werden.

Nekrotische Veränderungen der in eine peritoneale Tasche im Bauchraum der Nacktmaus eingebrachten Endometriumfragmente fanden sich bei Nisolle et al. (2000 a), sowohl bei Endometriumfragmenten, deren Wirte nicht hormonell behandelt wurden, als auch bei denjenigen, welche während des Versuchszeitraumes von 21 Tagen eine zweimalige Östrogengabe erhielten.

Generell adherierten die Endometriumfragmente mit ihrem Stromaanteil an das Wirtsgewebe, während sich das Drüsenepithel in keinem Fall in direktem Kontakt

zum Wirtsgewebe befand. Dies bestätigt die Versuchsergebnisse von Nisolle et al. (2000 b) und Witz et al. (1999).

Cytokeratin wird in den Drüsenzellen des humanen Endometriums exprimiert (Moll et al. 1982). In der vorliegenden Arbeit diente dieser Marker einerseits zur histologischen Bestätigung der makroskopisch aufgefundenen endometrialen Läsion, andererseits zur Beurteilung des Differenzierungszustandes des humanen Endometriumgewebes im Verlauf der Inkubation in der Nacktmaus. Während des Versuchszeitraumes von 21 Tagen wurde Cytokeratin in allen Drüsenepithelien der eingebrachten humanen Endometriumfragmente exprimiert, während die Stromazellen das Intermediärfilament Vimentin exprimierten. Zusätzlich zu der Expression von Cytokeratin zeigt sich ab dem 14. Tag der Kultivierung eine Expression von Vimentin in den Drüsenepithelien, in deren unmittelbarer Umgebung sich das Stroma auflockert und die Anzahl der umgebenden Stromazellen ab-, sowie die Interzellularsubstanz zunahm. Durch das Fehlen des Einflusses der Stromazellen begann hier ein Dedifferenzierungsprozeß des Drüsenepithels.

Dies unterstreicht die Ergebnisse von Nisolle et al. (2000 a), die nach drei Wochen der Kultivierung den Zusammenhang zwischen einem gut entwickelten Stroma und einem hohen Epithelaufbau, sowie einem schlecht entwickelten Stroma und einem flachen Epithel der eingebrachten Fragmente beschrieben. Weitere Markermoleküle für ein differenziertes Endometriumgewebe stellen E- Cadherin an den Zellgrenzen der Epithelzellen (Inoue 1992, Beliard 1997), sowie die Gap Junction-Proteine Connexin 26 im luminalen und Drüsenepithel und Connexin 43 im Drüsenstroma (Jahn et al. 1995, Spray 1998) dar. Die Expression dieser drei Proteine konnte in den humanen Endometriumfragmenten auch nach 14 Tagen Kultur in der Nacktmaus nachgewiesen werden.

Nach einer Kulturdauer von 14 Tagen zeigen sich jedoch erste Dedifferenzierungsprozesse in den Endometriumfragmenten, so dass die Einsetzbarkeit dieses Modells nach diesem Zeitraum abnimmt.

4.3 Angiogenese

Als Angiogenese wird das Entstehen neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen bezeichnet. Sie erfolgt durch eine Aktivierung der Endothelzellen mit einem Durchlässigwerden der Basalmembran durch verschiedene Angiogenesefaktoren (z.B. VEGF- Vascular endothelial growth factor, VPF- Vascular permeability factor, FGF- Fibroblast growth factor) (Folkman und Shing 1992). Durch Teilung der Endothelzellen entsteht ein Spross, der sich auf die Reizquelle, welche die Angiogenesefaktoren ausschüttet hin entwickelt. Es folgt eine Aushöhlung der Zellen zu Röhre. Dieser Prozess wiederholt sich so lange, bis der Spross Anschluss an ein Blutgefäß findet und die Blutzirkulation einsetzt (Folkman und Shing 1992). Physiologische Prozesse der Angiogenese sind z.B. Wundheilung und die Proliferation des Endometriums. Im klinischen Erscheinungsbild der Endometriose wurde immer wieder eine Hypervaskularisation sowohl des Endometriumherdes als auch seiner Umgebung beobachtet (Oosterlynck et al. 1993, Obermaier et al. 1999). Auch Donnez et al. (1998) und Abulafia und Scherer (1999) sahen in der Angiogenese einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung der Endometriose. Bereits Nisolle et al. (2000 a) beschrieben nach 21 Tagen Kultivierungsdauer von Endometriumfragmenten in einer peritonealen Tasche in der Bauchhöhle der Nacktmaus ein aktives Gefäßnetz im Bereich der eingebrachten Endometriumfragmente.

In der vorliegenden Arbeit wurden der Ursprung der Gefäße sowie der zeitliche Verlauf ihrer Entwicklung genauer beschrieben. Nach zwei Tagen Kultivierungsdauer der Endometriumfragmente in der Nacktmaus konnte noch kein Endothel murinen Ursprungs in den endometrialen Läsionen detektiert werden, diese zeigten sich jedoch bereits ab dem 4. Tag der Inkubation in der Nacktmaus in den transplantierten humanen Fragmenten. Mit zunehmender Kulturdauer nahm die Durchsetzung der humanen Fragmente mit Mausendothel ausgehend von der Anheftungsstelle des Fragmentes am Wirtsgewebe zu. Bereits am 9. Tag nach der Transplantation waren die Endometriumfragmente völlig mit Endothel der Nacktmaus durchsetzt. Die Blutversorgung der transplantierten Fragmente wurde somit mit steigender Dauer der Kultivierung in der Nacktmaus von den Gefäßen des Wirtes übernommen, wobei die Art und das Ausmaß der Gefäßeinsprossung unabhängig waren von den Organen an denen das Fragment adhiert war und

sich nicht zwischen fixierten versus frei in die Bauchhöhle eingebrachten Fragmenten unterscheiden.

Im Gegensatz hierzu zeigten die Gefäße des humanen Endometriums Merkmale der Dedifferenzierung. Die Expression des von- Willebrand Faktors nahm mit zunehmender Kulturdauer deutlich ab und war nach 14 Tagen in den Gefäßen der endometrialen Läsionen nicht mehr nachweisbar.

Ein ebenfalls wichtiger Faktor für die Angiogenese in den Läsionen ist der vascular endothelial growth factor (VEGF) (Smith 1998). Ramey und Archer (1993) diskutierten, dass eine Freisetzung von Angiogenesefaktoren in das Peritoneum eine Proliferation der Mikrovaskularisation hervorrufen könnte, welche dann durch den erhöhten Transport von Sauerstoff und Nährstoffen ein optimales Ziel für die Anheftung von Endometriumfragmente darstellen könnte. 1999 wiesen Fujishita et al. eine erhöhte Konzentration von VEGF in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose nach. Zudem fanden sie eine zyklusunabhängige VEGF Expression im Stroma und Epithel des Endometrium. Auch in dem hier verwendeten Tiermodell wird die Proliferation der peritonealen Mikrogefäße der Nacktmaus vermutlich durch die humanen Endometriumfragmente induziert. Inwieweit in diesem Modell VEGF eine Rolle spielt, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

Aufgrund der starken Angiogenese bietet das hier vorgestellte Tiermodell die Möglichkeit, den Einfluss von Angiogenese- Inhibitoren auf die peritonealen Endometriumfragmente zu untersuchen.

4.4 Einfluss von SERM und Antigestagen auf Morphologie und Angiogenese der in der Nacktmaus kulivierten Endometriumfragmente

Erste Versuche der Behandlung mit einem SERM bzw. Antigestagen zeigten keinen Einfluss auf die Angiogenese. Sie war an Tag 7 der Versuchsdauer vergleichbar mit denen der Kontrollgruppe, die das Vehikel erhalten hatte.

Die Morphologie der Fragmente, deren Wirte mit einem Antigestagen behandelt wurden, zeigten ebenfalls keine Unterschiede zu den Kontrolltieren. Bereits Chwalisz et al. (1991) fanden bei Versuchen mit ovariectomierten Kaninchen keinerlei Veränderungen des Endometrium durch Onapriston, einem Antigestagen.

Allerdings zeigten sich morphologische Veränderungen der endometrialen Drüsen bei den mit SERM behandelten Versuchstieren. Der Epithelverband der Drüsen erschien aufgelockert, das Drüsenstroma verquollen durch eine Zunahme der Interzellulärsubstanz. Bei manchen Fragmenten war eine zentrale Nekrose zu erkennen. Bei der Behandlung mit Idoxifen, einem bereits klinischen erprobten SERM, trat im Tierversuch eine Atrophie des Endometriums auf (Nuttall et al. 1998).

Diese Versuche liefern lediglich erste Hinweise zur Erprobung von Medikamenten in diesem Tiermodell und bedürfen weiterer Experimente, die jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit waren.

5 Schlussfolgerungen

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Tiermodell war es möglich, humane Endometriumfragmente bis zu 3 Wochen in der Nacktmaus zu kultivieren. Damit ist es in diesem Modell möglich frühe Stadien zellbiologischer Mechanismen, die an der Entstehung der Endometriose beteiligt sind, zu untersuchen.

Die frei in die Bauchhöhle der Nacktmaus eingebrachten endometrialen Fragmente hefteten sich bereits 2 Tage nach der Transplantation in die Nacktmaus an die verschiedenen Organe des Wirtes an. Bereits nach 4 Tagen konnte eine Angiogenese zur Versorgung der endometrialen Läsionen ausgehend von den murinen Gefäßen des Wirtes beobachtet werden. Während der gesamten Kulturdauer zeigte das Endometriumgewebe zu einem überwiegenden Teil einen guten morphologischen Erhalt, sowie die Expression von zellbiologischen Differenzierungsmarkern.

Die Kultivierung von humanem endometrialen Gewebe in der Peritonealhöhle der Nacktmaus stellt somit ein geeignetes Mittel dar, um die Wirkung verschiedener Substanzen, wie Hormone oder deren Antagonisten, sowie anti – angiogentische Faktoren zu testen. Dieses Modell bietet somit die Möglichkeit der Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte zur Behandlung der Endometriose.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kultur von humanem Endometriumgewebe in der Nacktmaus als Tiermodell zur Erforschung neuer Therapieansätze zur Behandlung der Endometriose validiert. Humanes Endometrium wurde über einen Zeitraum von bis zu 3 Wochen in der Bauchhöhle von Nacktmäusen kultiviert und nach verschiedenen Zeitintervallen morphologisch und mit Hilfe zellbiologischer Marker analysiert. Von den frei in die Bauchhöhle der Nacktmaus eingebrachten humanen Endometriumfragmenten konnten bis zu 20 % wieder aufgefunden werden, welche sich bevorzugt an Darm, Leber und Bauchwand anlagerten. Eine deutlich höhere Wiederauffindungsrate (bis 100%) zeigten Fragmente, die an den Darm, das Mesenterialfett oder die Bauchwand der Nacktmaus fixiert wurden. Die Fragmente adherierten an das Wirtsgewebe und zeigten bis zum 9. Tag der Inkubation in der Nacktmaus eine sehr gut erhaltene Morphologie. Ab dem 9. Tag war in einigen Fragmenten eine zystische Erweiterung des Drüsenlumens sowie eine Abflachung des Drüsenepithels zu beobachten. Die Drüsenepithelien exprimierten während des gesamten Kultivierungszeitraumes Cytokeratin. Vimentin wurde von den Stromazellen des humanen Endometriums exprimiert. Ab dem 14. Tag der Kultivierung wurde Vimentin zusätzlich zu Cytokeratin ausschließlich in den Epithelien der Endometriumdrüsen exprimiert, die von zellarmem Stroma umgeben waren, was als Zeichen einer Dedifferenzierung interpretiert werden kann. Die Expression von E-Cadherin und Connexin 26 in den Epithelien und Connexin 43 im Stroma blieb bis zu einer Kulturdauer von 14 Tagen erhalten. Bereits 4 Tage nach der Transplantation der Endometriumfragmente konnten Endothelien murinen Ursprungs im humanen Transplantat nachgewiesen werden. Die Expression von von-Willebrand-Faktor in den Gefäßen humanen Ursprungs in den Endometriumfragmenten war ab dem 14. Tag nach Transplantation in die Nacktmaus nicht mehr nachzuweisen. Die Behandlung der Nacktmäuse mit einem selektiven Östrogenrezeptor Modulator (SERM), nicht aber mit einem Antigestagen, führte zu geringen morphologischen Veränderungen der Endometriumfragmente. Die Endotheleinsprossung der Endometriumfragmente der mit SERM oder Antigestagen behandelten Nacktmäuse unterschied sich nicht von denen in der Kontrollgruppe. Die in dieser Arbeit vorgestellte Kultivierung von Endometrium in der Nacktmaus stellt ein geeignetes Tiermodell dar zur Untersuchung der Endometriose sowie zur Erforschung von neuen therapeutischen Konzepten zur Behandlung der Endometriose, z.B. durch Hormone, deren Antagonisten oder durch anti-angiogenetischen Faktoren.

7 Literaturverzeichnis

Abulafia, O., Sherer, D.M. (1999):
Angiogenesis of the Endometrium.
Obstet Gynecol Rev, 94, 148-153

American Fertility Society (1985):
Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis.
Fertil Steril, 43, 351-352

Ayers, J.W.T., Friedenstab, A.P. (1985):
Utero - tubal hypotonia associated with pelvic endometriosis.
Am Fert Soc Ann Meeting,41, 131

Bainczyk, K. (2001):
Entwicklung eines in vivo-Modells in der Nacktmaus und der NOD-SCID
Maus zur Untersuchung der humanen Endometriose.
Inaugural-Dissertation an der Justus-Liebig-Universität zu Gießen

Béliard, A., Donnez, J., Nisolle, M., Foidart, J.-M. (1997):
Localization of laminin, fibronectin, E-cadherin, and integrins in endometrium
and endometriosis.
Fertil Steril, 67, 266-272

Bergqvist, A., Jeppsson, S., Kullander, S., Ljungberg, O. (1985):
Human Uterine Endometrium and Endometriotic Tissue Transplanted Into
Nude Mice - Morphologic Effects of Various Steroid Hormones.
Am J Pathol, 121, 337-341

Bosma, M.J. (1989):
The scid Mutation: Occurrence and Effect.
Curr Top Microbiol Immunol, 152, 3-15

Bruner, K.L., Matrisian L.M., Rodgers, W.H., Gorstein, F., Osteen, K.G. (1997):

Suppression of Matrix Metalloproteinases Inhibits Establishment of Ectopic Lesions by Human Endometrium in Nude Mice.

J. Clin. Invest., 99, 2851-2857

Chwalisz, K., Hegele-Hartung, C., Fritzscheier, K.-H., Beier, H.M., Elger, W. (1991):

Inhibition of the Estradiol-Mediated Endometrial Gland Formation by the Antigestagen Onapristone in Rabbits: Relationship to Uterine Estrogen Receptors.

Endocrinology, 129, 312-322

Donnez, J., Smoes, P., Gillerot, S., Casanas-Roux, F., Nisolle, M. (1998):

Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis.

Hum Reprod, 13, 1686-1690

Folkman, J., Shing, Y. (1992):

Angiogenesis.

J Biol Chem, 267, 10931-10934

Fujishita, A., Hasuo, A., Khan, K.N., Masuzaki, H., Nakashima, H., Ishimaru, T. (1999):

Immunohistochemical Study of Angiogenic Factors in Endometrium and Endometriosis.

Gynecol Obstet Invest, 48, 36-44

Halban, J. (1925):

Hysteroadenosis metastatica (Die lymphogene Genese der sog. Adenofibromatosis heterotopica).

Arch Gynaecol, 124, 457

Halme, J., Hammond, M.G., Hulka, J.F., Shailaja, G.R., Talbert, L.M. (1984):
Retrograde Menstruation in Healthy Women and in Patients With
Endometriosis.

Obstet and Gynecol, 64, 151-154

Hebermann, R.B. (1978): Natural cell-mediated cytotoxicity in nude mice.
In: Fogh J., Giovanella B.C. (Eds.): The nude mouse in experimental and
clinical research. S. 135-166

New York: Academic Press

Inoue, M., Ogawa, H., Miyata, M., Shiozaki, H., Tanizawa, O. (1992):
Expression of E-Cadherin in Normal, Benign, and Malignant Tissues of
Female Genital Organs.

Am J Clin Pathol, 98, 76-80

Jacobson V.C. (1922):

The autotransplantation of endometrial tissue in the rabbit.

Arch Surg, 5, 281-300

Jahn, E., Classen-Linke, I., Kusche, M., Beier, H.M., Traub, O.,
Grümmer R., Winterhager, E. (1995):

Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout
the menstrual cycle.

Hum Reprod, 10, 2666-2670

Jenkins, S., Olive, D.L., Haney, A.F. (1986):

Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution.

Obstet Gynecol, 67, 335-338

Jones, R.C. (1984):

The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-
40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental
endometriosis in the rat.

Acta Endocrinol, 106, 282-288

Koninckx, P.R., Kennedy, S.H., Barlow, D.H. (1998):
Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid.
Hum Reprod Update, 4, 741-751

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R. (1982):
The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal
Epithelia, Tumors and Cultured Cells.
Cell, 31, 11-24

McLaren, J., Prentice, A. (1996):
New aspects of pathogenesis of endometriosis.
Current Obstet Gynaecol, 6, 85-91

Meyer, R. (1919):
Über den Stand der Frage Adenomyositis und
Adenomatome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis
serosoepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa.
Zbl. f. Gynäk., 43, 745-750

Moghissi, K. S. (1999):
Medical Treatment of Endometriosis.
Clin Obstet Gynecol, 42, 620-632

Mori, T., Singtripop, T., Kawashima S. (1991):
Animal model of uterine adenomyosis: Is prolactin a potent inducer of
adenomyosis in mice ?
Am J Obstet Gynecol, 165, 232-234

Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Anaf, V., Mine, J.-M., Donnez, J. (1993):
Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis.
Fertil Steril, 59, 681-684

Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Marbaix, E., Jadoul, P., Donnez, J. (2000) a :
Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice.
Hum Reprod, 15, 572-577

Nisolle, M., Casanas-Roux, F., Donnez, J. (2000) b :
Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual
endometrium in nude mice.
Fertil Steril, 74, 306-312

Noyes, R.W., Hertig, A.T., Rock, J. (1950):
Dating the Endometrial Biopsy.
Fertil Steril, 1, 3-25

Nuttall, M.E., Bradbeer, J.N., Stroup, G.B., Nadeau, D.P., Hoffman, S., Zhao,
H., Rehm, S., Gowen, M. (1998):
Idoxifene: a novel selective estrogen receptor modulator prevents bone loss
and lowers cholesterol levels in ovariectomized rats and decreases uterine
weight in intact rats.
Endocrinology, 139, 5224-5234

Obermair, A., Preyer, O., Leodolter, S. (1999):
Angiogenesis in Gynäkologie und Geburtshilfe.
Wien Klin Wochenschr, 111, 262-277

Oosterlynck, D.J., Meulemann, C., Sobis, H., Vandeputte, M., Koninckx, P.R.
(1993):
Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis.
Fertil Steril, 59, 778-782

Ramey, J.W., Archer, D.F. (1993):
Peritoneal fluid: its relevance to the development of endometriosis.
Fertil Steril, 60, 1-14

Ridley, J.H., Edwards, I.K. (1958):
Experimental endometriosis in the human.
Am J Obstet Gynecol, 76, 783-790

Russell, W.W. (1899):
Aberrant portions of the Müllerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of
Müllerian origin.
Bull. John Hopkins Hosp., 10, 8-10

Salamanca, A., Beltran, E. (1995):
Subendothelial contractibility in menstrual phase visualized by transvaginal
sonography in patients with endometriosis.
Fertil Steril, 64, 193-195

Sampson, J.A. (1921):
Perforating hemorrhagic (chocolate) cysts in the ovary, their importance and
especially their relation to pelvic adenomas of the endometrial type.
Arch. Surg., 3, 245-323

Sampson, J.A. (1925):
Heterotopic or misplaced endometrial tissue.
Am J Obstet Gynecol, 10, 649-664

Schweppe, K.-W. (1984):
Morphologie und Klinik der Endometriose.
Stuttgart-New York: Schattauer Verlag

Schweppe, K.-W., Dmovski, W. P., Rolland, R. (1990):
Endometriose: Pathophysiologie, Klinik und neue Behandlungsmöglichkeiten.
Frankfurt/Main: Hoechst Verlag

Scott, R.B., Wharton, L.R. Jr. (1957):

The effect of estrone and progesterone on the growth of experimental endometriosis in Rhesus monkeys.

Am J Obstet Gynecol, 74, 852-865

Smith, S.K. (1998):

Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium.

Hum Reprod Update, 4, 509-519

Spray, D. C. (1998):

Gap Junction Proteins-Where They Live and How They Die.

Circ Res, 83, 679-681

Tabibzadeh, S., Miller, S., Dodson, W.C., Satyaswaroop, P.G. (1999):

An experimental Model for the Endometriosis in Athymic Mice.

Front Biosci, c4-9

Thomas, E.J., Prentice, A. (1992):

The aetiology and pathogenesis of endometriosis.

Reprod Med Rev, 1, 21-36

Traub, O., Look, J., Dermietzel, R., Brümmer, F., Hülser, D., Willecke, K. (1989):

Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver cultured hepatocytes.

J Cell Biol, 108, 1039-1051

Traub, O., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Elfang, C., Bastide, B., Scheidtmann, K.H., Hulser, D.F., Willecke, K. (1994):

Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin 40 and – 43 in mouse tissues and transfected human cells.

Eur J Cell Biol, 64, 101-112

van der Linden, P.J.Q., de Goeij, A.F.P.M., Dunselmann, G.A.J., Erkens, H. W.H., Evers, J.L.H. (1996):
Endometrial cell adhesion in an in vitro model using intact amniotic membranes. *Fertil Steril*, 65, 76-80

Vestweber, D., Kemler, R. (1984):
Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissue.
Exp Cell Res., 152, 169-178

Vinatier, D., Cosson, M., Dufour, P. (2000):
Is endometriosis an endometrial disease?
*Eur J Gynecology Reprod Biol
Biology*, 91, 113-125

Wheeler, J.M., Knittle, J.D., Miller, J.D. (1993):
Depot leuprolide versus danazol in treatment of women with symptomatic endometriosis.
Am J Obstet Gynecol, 167, 1367-1371

Wingfield, M., Macpherson, A., Healy, D.L., Rogers, P.A.W. (1995):
Cell proliferation is increased in the endometrium of women with endometriosis.
Fertil Steril, 64, 340-346

Witz, C.A., Monotoya-Rodriguez, I.A., Schenken, R.S.(1999):
Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion.
Fertil Steril, 71, 56-60

Zamah, N., Dodson, M.G., Stephens, L.C., Buttram, V.C., Besch, P.K.,
Kaufman, R.H. (1984):

Transplantation of normal and ectopic human endometrial tissue into athymic
nude mice.

Am J Obstet Gynecol, 149, 591-597

8.0 Anhang

Frau Prof. Dr. E. Winterhager danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas und ihre Bereitschaft mir bei allen Entwicklungsschritten dieser Arbeit als Entscheidungshilfe zur Seite gestanden zu haben.

Aus der Abteilung für Gynäkologie des Universitätsklinikums Essen danke ich Herrn Prof. Dr. A. E. Schindler und Herrn PD Dr. P. A. Regidor für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial.

Frau PD Dr. Ruth Grümmer danke ich für die ausdauernde Unterstützung vom Beginn bis zum Ende dieser Arbeit. Mit ihrer Hilfe lernte ich die unweigerlichen Tücken des wissenschaftlichen Arbeitens zu überstehen. Ich bedanke mich für ihre Ratschläge zu allen großen und kleinen Details dieser Arbeit.

Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Frau Tlolka, die mich in die Techniken der histologischen Aufarbeitung von Gewebe einführte und immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenfalls danken möchte ich Frau Rauter für ihre Arbeit an immunhistochemischen Inkubationen. Ferner gilt mein Dank ganz besonders Herrn Kittel ohne welchen die Abbildungen in der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wären.

Ich möchte mich auch bei Herrn Christian Knoll bedanken, der mir stets eine Hilfe in allen Fragen der Ausgestaltung dieser Arbeit war und mein Durchhaltevermögen stärkte. Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, in der jedes Mitglied mich auf seine individuelle Art und Weise förderte und ohne deren Unterstützung dies alles nicht möglich gewesen wäre.

9.0 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frauke Schwarzer
Geburtsdatum/-ort: 10.09. 1976, Mülheim an der Ruhr
Wohnort: Sieverstedt
Familienstand: ledig
Eltern: Reinhard Schwarzer und
Rosemarie Schwarzer, geb. Goelitz

Schulbildung

10/1983-06/1987 Grundschule an der Nordstraße in Mülheim an der Ruhr
07/1987-06/1996 Besuch des Gymnasium Heißen in Mülheim an der Ruhr
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität-
Gesamthochschule Essen
10/1996-03/1999 Vorklinischer Studienabschnitt an der Universität-
Gesamthochschule Essen mit ärztlicher Vorprüfung
04/1999-09/2002 klinischer Studienabschnitt an der Universität- Gesamthochschule
Essen
09/2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2002-09/2003 Praktischen Jahr am evangelischen Krankenhaus in Oberhausen
(Wahltertial in der Abteilung für Geriatrie)
11/2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Abschluss des Studiums der Humanmedizin

