

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

**VASKULARISIERUNG PERITONEALER ENDOMETRIOSE-
HERDE DURCH HOMING ZIRKULIERENDER
ENDOTHELIALER PROGENITORZELLEN –
EIN NEUER PATHOMECHANISMUS DER ENDOMETRIOSE**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2016

Vorgelegt von Christian Giebels
Geboren am 13.05.1985 in Neunkirchen/Saar

Datum:

Dekan:

Berichterstatter:

INHALT

1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2.	SUMMARY.....	3
3.	EINLEITUNG.....	5
4.	ZIEL DER STUDIE.....	12
5.	MATERIAL UND METHODIK.....	13
5.1.	VERSUCHSTIERE.....	13
5.2.	KNOCHENMARKTRANSPLANTATION.....	14
5.3.	MODELL DER PERITONEALEN ENDOMETRIOSE.....	16
5.3.1.	Bestimmung des Zyklusstadiums.....	16
5.3.2.	Isolierung des Endometriumgewebes.....	17
5.3.3.	Transplantation der Uterusfragmente.....	18
5.4.	INTRAVITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	19
5.4.1.	Anteil perfundierter Endometrioseherde.....	21
5.4.2.	Funktionelle Kapillardichte.....	22
5.4.3.	Gefäßdurchmesser.....	22
5.4.4.	Blutzellgeschwindigkeit.....	22
5.4.5.	Mikrovaskulärer Blutfluss.....	23
5.4.6.	Scherrate.....	23
5.5.	OBERFLÄCHE DER ENDOMETRIOSEHERDE.....	23

5.6.	HISTOLOGIE.....	24
5.6.1.	Konventionelle Histologie.....	24
5.6.2.	Immunhistochemie.....	24
5.6.2.1.	<i>Dichte CD31-positiver GefäÙe.....</i>	<i>26</i>
5.6.2.2.	<i>Anteil GFP-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl.....</i>	<i>26</i>
5.6.2.3.	<i>Anteil GFP-positiver Zellen an allen Endothelzellen.....</i>	<i>26</i>
5.6.2.4.	<i>Anteil SDF-1-positiver Zellen.....</i>	<i>26</i>
5.7.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	27
5.8.	EXPERIMENTELLES PROTOKOLL.....	28
5.9.	STATISTIK.....	28
6.	ERGEBNISSE.....	30
6.1.	MORPHOLOGIE DER ENDOMETRIOSEHERDE.....	30
6.1.1.	OberfläÙe.....	30
6.1.2.	Makro- und mikroskopische Veränderungen.....	30
6.2.	VASKULARISIERUNG DER ENDOMETRIOSEHERDE.....	32
6.2.1.	Mikrovaskuläres Netzwerk.....	32
6.2.1.1.	<i>Anteil perfundierter Endometrioseherde.....</i>	<i>32</i>
6.2.1.2.	<i>Funktionelle Kapillardichte.....</i>	<i>33</i>
6.2.2.	Mikrohämodynamik.....	34
6.2.3.	GefäÙdichte.....	35
6.3.	REKRUTIERUNG VON EPCs IN ENDOMETRIOSEHERDE.....	36
6.3.1.	Anteil GFP-positiver Zellen.....	36
6.3.2.	Lokalisation GFP-positiver Zellen innerhalb der Herde.....	36

6.3.3.	Anteil GFP-positiver Endothelzellen.....	37
6.3.4.	Nachweis CD34/VEGFR-2-positiver EPCs.....	38
6.4.	SDF-1-EXPRESSION IN ENDOMETRIOSEHERDEN.....	39
6.5.	VASKULARISIERUNG UND EPCs IN AMD3100-BEHANDELTEN TIEREN.....	41
6.6.	EPC-ANZAHL IM PERIPHEREN BLUT, KNOCHENMARK UND MILZ	42
6.7.	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	43
7.	DISKUSSION.....	45
7.1.	DISKUSSION DER METHODEN.....	45
7.2.	DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.....	47
7.3.	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND KLINISCHE PERSPEKTIVEN.....	51
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	53
9.	DANKSAGUNG.....	69
10.	PUBLIKATIONEN.....	70

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Endometriose zählt zu den häufigsten gynäkologischen Erkrankungen bei Frauen im geschlechtsreifen Alter. Histopathologisch ist die Endometriose definiert durch das Vorhandensein von funktionsfähigem Endometrium außerhalb der Gebärmutterhöhle, welches durch retrograde Menstruation in die Bauchhöhle gelangt und dort anwächst. Die Endometriose ist eine der Hauptursachen für unerfüllten Kinderwunsch. Endometriose-Patientinnen leiden häufig unter zyklusabhängigen Unterleibschmerzen. In den meisten Fällen ist bis zur endgültigen Diagnosestellung eine aufwendige Diagnostik bis hin zur operativen Bauchspiegelung notwendig.

Eine wesentliche Voraussetzung für das Überleben von Endometrioseherden in der Bauchhöhle ist die Angiogenese, d.h. die Gefäßneubildung aus bereits bestehenden Gefäßen. Durch das Einwachsen neuer Gefäße in die Herde werden diese mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Ein weiterer Mechanismus, der zur Ausbildung neuer Gefäße beiträgt, ist die Vaskulogenese, d.h. der Einbau von endothelialen Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) in das Endothel der Gefäße. Bisher ist jedoch noch völlig ungeklärt, ob dieser Mechanismus auch bei der Endometriose von Bedeutung ist.

Um dies zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit peritoneale Endometrioseherde in bestrahlten FVB/N-Mäusen induziert, denen zuvor das Knochenmark von FVB/N-TgN (*Tie2/green fluorescent protein* [GFP]) 287 Sato-Mäusen durch Injektion über die Schwanzvene transplantiert wurde.

Die Rekrutierung GFP-positiver EPCs in diesen Endometrioseherden und deren Vaskularisierung wurde anschließend mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und immunhistochemischer Techniken über einen Zeitraum von vier Wochen analysiert. Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen konnte weiterhin die Anzahl *stem cell antigen* (*Sca*)-1/*vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-2 positiver EPCs im Blut und in hämatopoetischen Organen wie Milz und Knochenmark von zusätzlich operierten Endometriose- und Kontrollmäusen bestimmt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass circa 15% der Zellen des Gefäßendothels in den induzierten peritonealen Endometrioseherden GFP-positiv waren. Diese EPCs wurden mit zunehmender Vaskularisierung der Herde in die neuen Gefäße integriert, was mit einer vermehrten Expression des Zytokins *stromal cell derived factor* (SDF)-1 einher ging. Allerdings war die Anzahl von EPCs im Blut, im Knochenmark und in der Milz von Mäusen mit peritonealen Endometrioseherden im Vergleich zu sham-operierten Kontrollmäusen nicht erhöht.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in einem weiteren Teil der Arbeit knochenmarksubstituierte Tiere mit Endometrioseherden über einen Zeitraum von zwei Wochen mit dem SDF-1/*chemokine receptor type* (CXCR) 4-Antagonisten AMD3100 behandelt. Dies resultierte in einer signifikant reduzierten Anzahl rekrutierter EPCs in den Endometrioseherden. Infolgedessen wiesen diese Herde auch eine verschlechterte Vaskularisierung auf.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Vaskulogenese, d.h. die Neubildung von Gefäßen aus EPCs, ein wesentlicher neuer Mechanismus in der Pathogenese der Endometriose ist.

2. SUMMARY

Endometriosis is one of the most common gynecological diseases in women of reproductive age. Endometriosis is defined by the presence of functional endometrium outside the uterine cavity, which reaches the abdominal cavity by retrograde menstruation. Endometriosis is one of the major causes of female infertility. Endometriosis patients often suffer from cycle-dependent abdominal pain. In most cases, a complex diagnostic investigation up to a diagnostic laparoscopy is necessary to set the final diagnosis.

An essential prerequisite for the survival of endometriotic lesions in the abdominal cavity is angiogenesis, i.e. the development of new blood vessels from pre-existing ones. The ingrowing blood vessels supply the lesions with oxygen and nutrients. Another mechanism, which contributes to the formation of new blood vessels, is vasculogenesis, i.e. the incorporation of *endothelial progenitor cells* (EPCs) in the endothelium of blood vessels. However, it is still unclear whether this mechanism is also important in the pathogenesis of endometriosis.

To investigate this in the present study, peritoneal endometriotic lesions were induced in irradiated FVB/N mice, which were reconstituted with the bone marrow from FVB/N-TgN (*Tie2/green fluorescent protein* [GFP]) 287 Sato mice by injection via the tail vein.

The recruitment of GFP-positive EPCs in these endometriotic lesions and their vascularization were analyzed using intravital fluorescence microscopy and immunohistochemical techniques over a period of four weeks. Moreover, the number of *stem cell antigen (Sca)-1/vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-2 positive EPCs was assessed in the blood and hematopoietic organs, such as spleen and bone marrow, in additional mice with endometriotic lesions and control mice by flow cytometry.

The results of this thesis show that approximately 15% of all endothelial cells in the induced peritoneal endometriotic lesions were GFP-positive. These EPCs were integrated in the new vessels during vascularization of the lesions, which was

associated with an increased expression of the cytokine *stromal cell derived factor* (SDF)-1. However, the number of EPCs in blood, bone marrow and spleen of mice with peritoneal endometriotic lesions was not increased when compared to sham-operated control mice.

Based on these results, additional bone marrow-substituted animals with endometriotic lesions were treated over a period of two weeks with the SDF-1/*chemokine receptor type* (CXCR) 4 antagonist AMD3100. This resulted in a significantly reduced number of recruited EPCs in the endometriotic lesions. Consequently, these lesions also showed an impaired vascularization.

In summary, the present study indicates for the first time that vasculogenesis, i.e. the formation of new vessels from EPCs, represents an important novel mechanism in the pathogenesis of endometriosis.

3. EINLEITUNG

Die Endometriose ist definiert als das ektipe Vorkommen von Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle und stellt zurzeit eine der häufigsten gutartigen Krankheiten in der Gynäkologie dar [GALLE, 1989]. Die Prävalenz bei symptomfreien Frauen liegt zwischen 2 und 50% in Abhängigkeit von den diagnostisch gewählten Kriterien und den untersuchten Patientenkollektiven [DUNSELMAN *et al.*, 2014; LEONE ROBERTI MAGGIORE *et al.*, 2016]. Kardinalsymptome der Endometriose sind Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Defäkationsschmerzen sowie chronische Unterbauchschmerzen. Bei ca. 50% aller Frauen mit bisher unerfülltem Kinderwunsch konnte eine Endometriose als Ursache diagnostiziert werden [GIUDICE, 2010]. Des Weiteren ist das Risiko der Infertilität bei Endometriose-Patientinnen um das ca. 20fache im Vergleich zu gesunden Patientinnen erhöht [STRATHY *et al.*, 1982]. Daher stehen die betroffenen Frauen unter einem sehr hohen Leidensdruck. Durch aufwendige Diagnostik, häufige Krankenhausaufenthalte und Operationen und dem daraus resultierenden Arbeitsausfall kommt der Endometriose auch eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung zu [SOLIMAN *et al.*, 2016].

Aufgrund der Lokalisation von Endometrioseherden wird die Endometriose in zwei Subtypen eingeteilt. Die „Endometriosis genitalis“ mit Vorkommen von Endometrioseherden im kleinen Becken umfasst sowohl die „Endometriosis genitalis interna“ (Endometrioseherde im Myometrium des Uterus) als auch die „Endometriosis genitalis externa“ (Endometrioseherde an anderen Orten im kleinen Becken wie Vagina, Ovar und Douglas-Raum). Daneben werden unter der „Endometriosis extragenitalis“ Manifestationen zusammengefasst, bei denen sich Endometrioseherde außerhalb des kleinen Beckens entwickeln (z.B. Lunge, Skelettmuskulatur und Gehirn).

Die Geschichte der Endometriose geht bis auf das Jahr 1690 zurück, als Daniel Christianus Shroen aus heutiger Sicht die erste Beschreibung der Endometriose lieferte [SHROEN, 1690]. 1908 war es allerdings Thomas Stephen Cullen, der in seiner Schrift „Adenomyoma of the uterus“ als erster Wissenschaftler sowohl das morphologische als auch das klinische Bild der unter dem heutigen Begriff Endometriose bekannten Krankheit beschrieb [CULLEN, 1908].

John A. Sampson widmete sich zu Beginn des 20. Jahrhunderts vor allem den ursächlichen Entstehungsmechanismen der Endometriose [BENAGIANO *et al.*, 1991] und lieferte 1927 mit seiner Implantations- oder Transplantationstheorie eine erste und auch heute noch akzeptierte Theorie zur Pathogenese der Endometriose [SAMPSON, 1927]. Er ging davon aus, dass während der Menstruation Blut – und damit auch endometriales Gewebe – retrograd über die Tuben in die Bauchhöhle gelangt. Dort wiederum adhäriert das Gewebe bei günstigen Umgebungsbedingungen an der Bauchwand und den Organen des kleinen Beckens und beginnt zu proliferieren. Gestützt wird diese Theorie unter anderem durch die hohe Prävalenz der Endometriose bei jungen Frauen mit angeborenen Obstruktionen des menstruellen Ausflusstraktes mit konsekutiver retrograder Menstruation [SANFILIPPO *et al.*, 1986].

Neben Sampson entwickelte auch Meyer seine eigene Theorie zur Entstehung der Endometriose. Er postulierte in seiner „Zölon-Metaplasie-Theorie“, dass sich embryonales Zölonepithel, das unter anderem auch die Peritonealhöhle auskleidet, unter bestimmten Voraussetzungen metaplastisch zu endometrialem Gewebe umwandelt [MEYER, 1919]. Dafür spricht, dass sich sowohl das Epithel der serösen Körperhöhlen, als auch das Endometriumgewebe aus einem identischen Keimblatt, dem Mesoderm, entwickelt.

Halban sah in der hämatogenen und lymphatischen Streuung von endometrialen Zellen die Ursache für die Entstehung der Endometriose [HALBAN, 1924]. Dies könnte als Erklärung für das seltene Auftreten von Endometrioseherden dienen, welche weit entfernt vom kleinen Becken, wie z.B. in der Lunge oder im Gehirn, lokalisiert sind [ICHIDA *et al.*, 1993; SHIMIZU *et al.*, 1998].

Mit dem „*Tissue injury and repair*“ (TIAR)-Modell weisen LEYENDECKER *et al.* [2009] dem Uterus in der Entstehung der Endometriose die zentrale Rolle zu. Bei Patientinnen mit Endometriose ist die Funktion der Uterusmuskulatur im Sinne einer Dys- und Hyperperistaltik gestört. Dies führt zu Mikrotraumata im Myometrium bzw. in der Junktionalzone mit konsekutiver Translokation von Endometrium in die Uteruswand und in die Bauchhöhle. Dabei werden lokal Östrogene freigesetzt, die stimulierend auf die gestörte Peristaltik des Uterus wirken und so die weitere Autotraumatisierung im Sinne eines *Circulus vitiosus* verstärken [LEYENDECKER *et al.*, 1996].

Unabhängig von den zahlreichen Überlegungen zur Pathogenese der Endometriose ist heute bekannt, dass für eine langfristige Vitalität endometrialer Frag-

mente außerhalb der Gebärmutter die Angiogenese, d.h. die Ausbildung neuer Blutgefäße, unabdingbar ist [Taylor et al., 1997; GROOTHUIS et al., 2005]. Beweise hierfür liefern vor allem *in vivo* Studien, in denen die Anzahl und Größe der Endometrioseherde durch Behandlung mit anti-angiogenen Substanzen nach Transplantation deutlich reduziert werden konnten [NAP et al., 2004; LASCHKE et al., 2011; RUDZITIS-AUTH et al., 2013].

Die Angiogenese stellt einen komplexen Prozess dar, der zahlreiche Interaktionen zwischen löslichen Faktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix umfasst [LIEKENS et al., 2001]. Durch Gewebhypoxie werden viele pro-angiogene Faktoren ausgeschüttet, die zu einer Aktivierung und Proliferation der Endothelzellen bestehender Gefäße führen. Proteolytische Enzyme führen zu einem Abbau der Basalmembran dieser Gefäße, sodass die Endothelzellen schließlich in den interstitiellen Raum in Richtung des angiogenen Stimulus migrieren können. Dort bilden sich Gefäßsprossen („*sprouting angiogenesis*“) aus, in denen sich im Laufe des Prozesses ein Lumen formiert. Nachfolgend wandern Perizyten entlang dieser kapillaren Gefäßsprossen und legen sich zur Gefäßstabilisierung abluminal den Endothelzellen an (Abbildung 1). Am Ende dieses angiogenen Prozesses wird wieder eine neue Basalmembran um die Gefäße gebildet [D'AMORE et al., 1987].

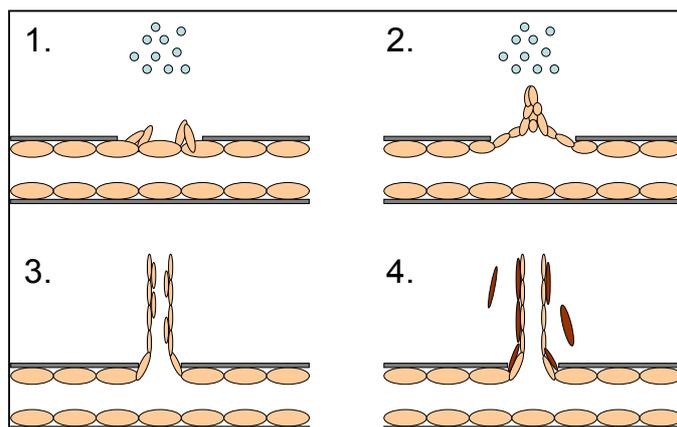


Abbildung 1: Schematische Darstellung charakteristischer Schritte der Angiogenese. 1. Aktivierung der Endothelzellen durch pro-angiogene Faktoren und Auflösung der Basalmembran, 2. Proliferation der Endothelzellen und Ausbildung eines Gefäßsprosses in Richtung des angiogenen Stimulus, 3. Ausbildung eines Lumens, 4. Anlagerung von Perizyten zur Wandstabilisierung.

Physiologisch spielt die Angiogenese sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im weiblichen Reproduktionszyklus eine wichtige Rolle [AUGUSTIN et al., 1995]. Bei pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Wundheilung [FRANK et al., 1995], der Psoriasis [FOLKMAN, 1972] sowie dem Tumorwachstum und

der Metastasierung [FOLKMAN, 1995], ist die Angiogenese ebenfalls von großer Bedeutung.

Wichtige pro-angiogene Faktoren, die sowohl physiologische als auch pathologische Angiogenese stimulieren, sind beispielsweise *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [FERRARA et al., 1998] und *fibroblast growth factor* (FGF) [ORTEGA et al., 1998].

Während der letzten Jahre haben eine Vielzahl von Studien an Tier und Mensch gezeigt, dass die Angiogenese nicht allein für die postnatale Neovaskularisierung verantwortlich ist, sondern dass auch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) aus dem Knochenmark an verschiedenen Prozessen im Sinne der Vaskulogenese beteiligt sind [ASAHARA et al., 1997; SHI et al., 1998; KOPP et al., 2006]. Vaskulogenese beschreibt dabei die Vorgänge der Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs in Endothelzellen und deren Zusammenlagerung zu neuen Gefäßen [RISAU und FLAMME et al., 1995] (Abbildung 2).

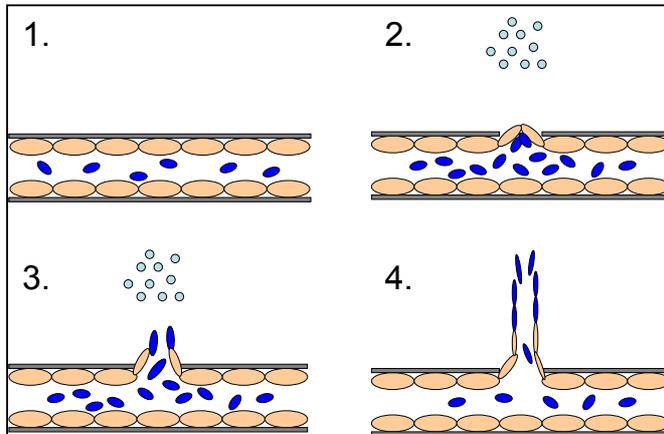


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prozesses der Vaskulogenese. 1. Zirkulierende EPCs in der Blutbahn, 2. Rekrutierung der EPCs und Aktivierung des Endothels durch angiogenen Stimulus, 3. Beginn der Differenzierung der EPCs zu Endothelzellen, 4. Ausdifferenzierung der EPCs und Bildung eines neuen Gefäßes.

Die oben genannten Studien konnten auch das lange Zeit gültige Dogma, dass EPCs nur während der Embryogenese eine Rolle spielen, widerlegen. In der Tat wurde gezeigt, dass Vaskulogenese auch im adulten Organismus stattfindet. So sind EPCs an der Neovaskularisierung bei Arteriosklerose [SATA et al., 2002], Umbauprozessen nach Myokardinfarkt [KOCHER et al., 2001], Frakturheilung [MATSUMOTO et al., 2008], bei diabetischer Retinopathie [GRANT et al., 2002] und Tumorstadium [PETERS et al., 2005] beteiligt.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich EPCs zusammen mit der hämatopoetischen Stammzelllinie aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten, entwickeln. Dieser lässt sich wiederum auf multipotente mesodermale Stammzellen zurückführen [WEISS *et al.*, 1996] (Abbildung 3).

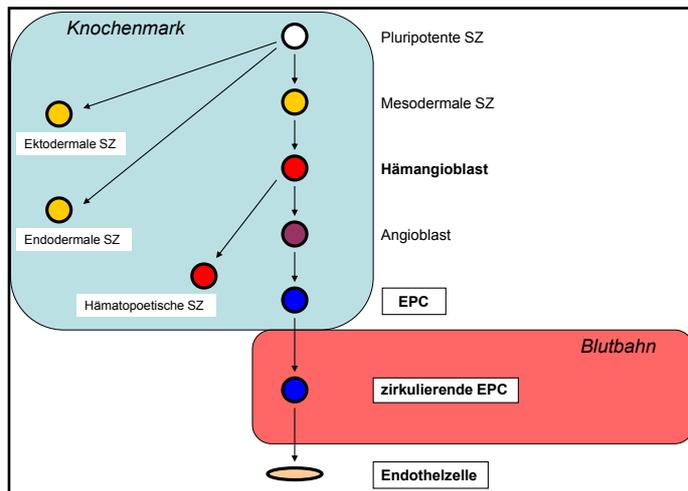


Abbildung 3: Entwicklungskaskade bis zur Endothelzelle über im Knochenmark ausgereifte EPCs aus Hämangioblasten (SZ: Stammzelle).

Die genauen Mechanismen der Ausdifferenzierung vom Hämangioblasten zur EPC sind noch weitgehend unbekannt. Wichtige Stimulatoren der Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark in die Blutbahn sind VEGF, Erythropoetin und *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) [HRISTOV *et al.*, 2009].

Zirkulierende EPCs lassen sich durch die Expression verschiedener Oberflächenantigene charakterisieren. Sie sind vor allem positiv für *cluster of differentiation* (CD) 34 und *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-2 sowie für *vascular endothelial* (VE)-Cadherin und für den Rezeptor des von-Willebrand-Faktors [HRISTOV *et al.*, 2003].

Typischerweise werden EPCs in ischämische Gewebeareale mit Endothelschäden rekrutiert. Dieser Vorgang ist reguliert über die Interaktion löslicher oder oberflächengebundener angiogener CC- und CXC-Chemokine mit ihren entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche [HRISTOV *et al.*, 2008].

Diesbezüglich fanden CERADINI *et al.* [2004] heraus, dass die Ausschüttung von *hypoxia induced factor* (HIF)-1 α die endotheliale Expression von *stromal derived*

factor (SDF)-1 stimuliert, welche wiederum zur Ansiedelung CXCR4-positiver EPCs in hypoxische Gewebe führt. HIF-1 α nimmt in der zellulären Antwort auf hypoxische Reize die zentrale Rolle ein [SEMENZA, 2003; FILIPPI *et al.*, 2016], wohingegen SDF-1 ein wichtiges Chemotaxin für adulte Stammzellen aus dem Knochenmark darstellt [VIRANI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015].

CXCR4 ist ein wichtiger Rezeptor bei der Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark und deren Homing in hypoxische Gewebe [CERADINI und GURTNER, 2005]. Eine Blockade des CXCR4-Rezeptors führt zu einer verstärkten Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen, aber auch zu einem reduzierten Homing dieser Zellen in hypoxischen Arealen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt die Vermutung nahe, dass auch während der Vaskularisierung sich entwickelnder Endometrioseherde EPCs aus dem Knochenmark mobilisiert werden und sich aktiv an der Bildung neuer Gefäße beteiligen. Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit erstmalig geprüft werden.

Hierzu wurden peritoneale Endometrioseherde in bestrahlten FVB/N-Mäusen induziert, denen zuvor das Knochenmark von FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato-Mäusen transplantiert wurde. Diese transgenen Mäuse exprimieren *green fluorescent protein* (GFP) unter der Transkriptionskontrolle des Tie2-Promotors [MOTOIKE *et al.*, 2000]. Tie2 ist eine Gefäßendothelzell-spezifische Rezeptortyrosinkinase, die an zahlreichen intrazellulären Signalkaskaden beteiligt ist, welche die Migration, Proliferation und Neustrukturierung des Aktin-Zytoskeletts in Endothelzellen steuern [LOUGHNA *et al.*, 2001]. Demzufolge konnte durch die Detektion GFP-positiver Signale in den Endometrioseherden das Vorhandensein Tie2-positiver EPCs aus dem Knochenmark nachgewiesen werden. Da die Rekrutierung von EPCs in Endometrioseherde entscheidend von der Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerkes und damit der Etablierung einer effektiven Blutperfusion während des Anwachsens des ektopen Gewebes abhängig ist, wurde zusätzlich der Vaskularisierungsprozess der Herde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und immunhistochemischen Techniken analysiert [LASCHKE *et al.*, 2005 und 2008].

Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit weitere knochenmarktransplantierte Versuchstiere mit dem Wirkstoff AMD3100 behandelt, der reversibel und spezifisch die Bindung von SDF-1 an seinen Rezeptor CXCR4 blockiert, um dadurch ein mögliches vermindertes Homing von EPCs in die Endometrioseherde nachweisen zu kön-

nen. Ursprünglich wurde dieser Wirkstoff aus der Gruppe der Bizyklame zur Behandlung des *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) entwickelt, da er den Eintritt des HIV-Virus in CD4-positive T-Zellen über eine CXCR4-Blockade inhibiert [*DONZELLA et al., 1998; DE CLERCQ, 2003*].

4. ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, erstmals den Prozess der Vaskulogenese in der Pathogenese der Endometriose zu untersuchen.

Hierzu wurde ein transgenes Endometriose-Mausmodell verwendet, was die Detektion GFP-positiver EPCs in peritonealen Endometrioseherden ermöglichte. Mit Hilfe dieses Modells sollten folgende Fragestellungen näher analysiert werden:

1. Werden zirkulierende EPCs aus dem Knochenmark in peritoneale Endometrioseherde rekrutiert?
2. Wie wirkt sich die Rekrutierung von EPCs auf die Vaskularisierung der Endometrioseherde aus?
3. Führt die Induktion peritonealer Endometrioseherde zu einer vermehrten Expression von SDF-1 im ektopen Gewebe?
4. Reduziert der selektive SDF-1/CXCR4-Rezeptorantagonist AMD3100 die Anzahl rekrutierter EPCs in den Endometrioseherden?
5. Wird durch die Induktion peritonealer Endometrioseherde die Zahl der EPCs im Blut und in blutbildenden Organen erhöht?

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. VERSUCHSTIERE

Alle Versuche wurden an 12 bis 16 Wochen alten weiblichen C57BL/6-Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), FVB/N-Mäusen und FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato-Mäusen (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) mit einem Gewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (*Abbildung 4*).



Abbildung 4: Weibliche FVB/N-Maus, Alter: 13 Wochen, Gewicht: 21 g; links daneben: Standardlaborfutter.

Die Tiere wurden während des Beobachtungszeitraumes unter kontrollierten Bedingungen in einem klimatisierten Raum mit 12-stündigem Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Der Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) war für die Tiere jederzeit gewährleistet.

Tiere, die während des Versuches bestrahlt und knochenmarksubstituiert wurden, waren in individuell belüfteten Käfigen (*individually ventilated cages, IVCs*) untergebracht. Alle anderen Tiere wurden in offenen Käfigen gehalten.

Sämtliche Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz sowie dem Leitfaden für den Umgang mit Versuchstieren durchgeführt [NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1985] und von den örtlichen Behörden (Landratsamt der Stadt Homburg/Saar) genehmigt.

5.2. KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION

Als Empfängertiere für die Knochenmarktransplantation wurden FVB/N Wildtyp-Mäuse verwendet. Diese wurden einer Ganzkörperbestrahlung mit einer letalen Dosis von 8,5 Gray (Gy) ausgesetzt, um aus ihnen anschließend chimäre Tie2/GFP-Tiere durch Transplantation des Knochenmarks aus FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato-Mäusen zu generieren. Die Vorbehandlung der Empfängertiere mit einer hohen Bestrahlungsdosis ist hierbei eine wichtige Voraussetzung für das Homing der transplantierten Knochenmarkstammzellen. Durch die Myeloablation kann sich das Knochenmark in den freigewordenen Nischen rekonstituieren. Des Weiteren führt die Bestrahlung zu einer Immunsuppression der Empfängertiere und beugt so einer möglichen Abstoßungsreaktion gegen die Knochenmarkstammzellen des Spenders vor [XIANG *et al.*, 2004].

Zur Isolierung des Knochenmarks wurden FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato-Spendermäuse durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis von Ketamin (Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und 2% Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) getötet. Nach der Injektion wurde sofort mit der Präparation der beiden Femora und Tibiae begonnen, um die Ischämiezeit des Knochenmarks so gering wie möglich zu halten. Hierfür wurden die Hinterläufe weit proximal im Bereich des Hüftgelenkes abgetrennt, das anliegende Gewebe (Haut, Muskeln, Faszien, Binde- und Fettgewebe) von Femur und Tibia entfernt und die Füße in Höhe der Sprunggelenke exzidiert (*Abbildung 5A*). Anschließend wurde das Gesamtpräparat durch Schnitt mit einer Skalpellklinge (Aesculap B. Braun Fig.19, Melsungen, Deutschland) in Höhe des Kniegelenkspaltes in Femur und Tibia aufgetrennt. Die Einzelpräparate wurden in einer sterilen *phosphate buffered saline* (PBS)-gefüllten Petrischale auf Eis gesammelt, um im Anschluss die proximalen und distalen Femur- bzw. Tibiaenden mit einer sterilen Skalpellklinge (Aesculap B. Braun Fig.19) zu eröffnen (*Abbildung 5B*). Unter Benutzung einer 26-G-Injektionskanüle (Sterican Einmalkanüle; B. Braun) wurden die Knochenmarklogen vorsichtig mit kalter *Hank's buffered salt solution* (HBBS) ausgespült und das Material in verschließbaren 50 ml Zentrifugenröhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gesammelt (*Abbildung 5C*).

Im Zelllabor wurde das so gewonnene Knochenmark vorsichtig über einen 40 µm Cell strainer (BD Biosciences) in ein weiteres steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches im folgenden Schritt 10 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifu-

giert wurde (Hettich, Universal 30 F, Tuttlingen, Deutschland). Das dabei entstehende Pellet wurde zum Waschen zweimal in 10 ml Natriumchlorid 0,9% resuspendiert und anschließend wiederum 10 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach anschließender Resuspension des Pellets in 800 µl kalter PBS-Lösung ergaben Zellzählungen eine Gesamtzellzahl von jeweils ca. 8×10^7 Knochenmarkszellen pro Pellet.

4 Stunden nach Bestrahlung wurden den Empfängertieren 200 µl dieser Suspension entsprechend 2×10^7 Knochenmarkstammzellen über die Schwanzvene injiziert (Abbildung 5D).

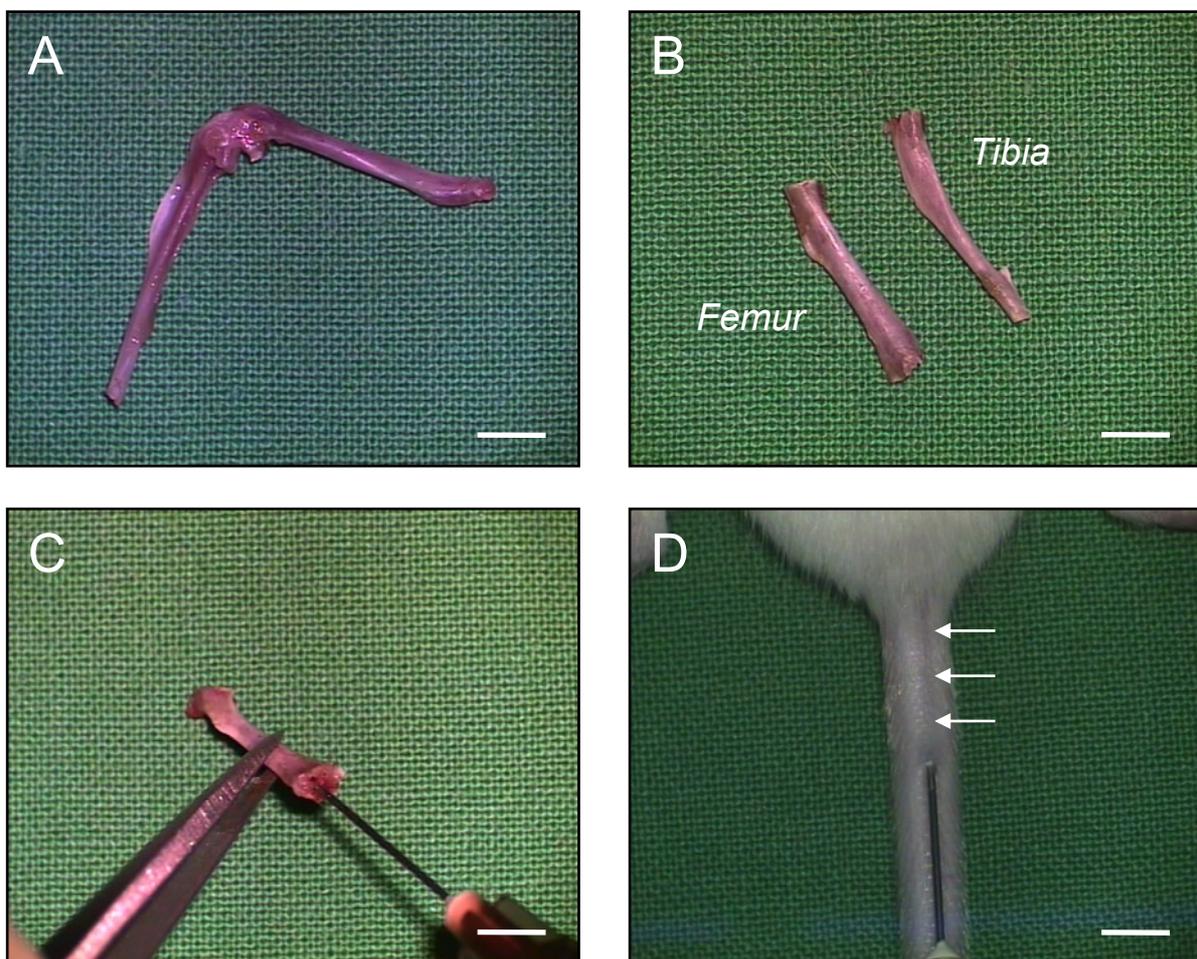


Abbildung 5: Wichtige Präparationsschritte bei der Extraktion und anschließenden Transplantation des Knochenmarks. **A:** Gesamtpräparat nach Abtrennen der Hinterläufe eines Spendertiers im Bereich des Hüftgelenkes und Entfernung des anliegenden Gewebes sowie der Füße. **B:** Femur und Tibia nach Entfernung der proximalen und distalen Enden zur Eröffnung des Knochenmarkraumes. **C:** Ausspülen des Knochenmarks. **D:** Injektion der aufbereiteten Stammzellsuspension in eine Schwanzvene des Empfängertiers (Pfeile) (Skalierung A-D: 3,1 mm).

Während den folgenden 4 Wochen waren die Tiere in IVCs untergebracht und wurden hinsichtlich ihres Gewichts, Verhaltens und Pflegezustands engmaschig kon-

trolliert. Dieser Zeitraum diente den Tieren zur vollständigen Rekonstitution ihres Knochenmarks und Immunsystems.

5.3. MODELL DER PERITONEALEN ENDOMETRIOSE

Als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung angiogener und vaskulogener Prozesse in Endometrioseherden wurde das Modell der peritonealen Endometriose gewählt, das sich ursprünglich auf *VERNON et al. [1985]* zurückführen lässt. In einer Vielzahl von Studien wurde dieses Modell modifiziert und erfolgreich zur Induktion von Endometrioseherden und deren Verlaufsdokumentation verwendet [*BECKER et al., 2006; FAINARU et al., 2008; LASCHKE et al., 2010*]. Dieses peritoneale Modell gestattet es, im Versuchstier Endometrioseherde zu induzieren, wie sie auch beim Menschen gehäuft vorkommen.

5.3.1. Bestimmung des Zyklusstadiums

Weibliche geschlechtsreife Mäuse weisen unter physiologischen Bedingungen einen regelmäßigen vier bis fünf Tage dauernden Menstruationszyklus auf. Dieser lässt sich in die Stadien Proestrus, Estrus, Metestrus und Diestrus einteilen [*MARCONDES et al., 2002*], welche sich durch charakteristische zelluläre Veränderungen des Vaginalepithels unterscheiden.

Um in der vorliegenden Arbeit Diskrepanzen bezüglich des zyklusabhängigen Hormonstatus der Versuchstiere möglichst auszuschließen, wurde zur Transplantation nur Endometrium von Mäusen entnommen, die sich im Estrus befanden. Das Zyklusstadium wurde anhand einer vaginalen Spülzytologie mikroskopisch bestimmt. Hierzu wurden mit einer Pipette 15 µl Natriumchlorid 0,9% vorsichtig in die Vagina appliziert und anschließend auf einen Glasobjektträger pipettiert. Bei der darauffolgenden lichtmikroskopischen Untersuchung (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) konnte das Zyklusstadium der Mäuse anhand der charakteristischen Zellzusammensetzung und -morphologie im Präparat bestimmt werden [*CALIGIONI, 2009*]. Hierbei wiesen Mäuse im Estrus typischerweise zahlreiche abgeplattete, große Superficialzellen auf. Parabasal- und Intermediärzellen waren im Estrus kaum zu finden.

5.3.2. Isolierung des Endometriumgewebes

Die Anatomie des Uterus ist bei Nagetieren im Vergleich zum Menschen grundlegend verschieden. Mäuse besitzen einen Uterus duplex, d.h. einen nach beiden Seiten getrennt angelegten Uterus mit zwei Uterushörnern, die in der vorliegenden Studie beide nach standardisiertem Vorgehen entnommen wurden.

Zur Isolierung der Uterushörner wurden weibliche FVB/N-Spendermäuse durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg Körpergewicht [KG]; Pharmacia GmbH) und 2% Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun, Bayer) anästhesiert. Nach entsprechender Fixierung der Tiere in Rückenlagerung und Desinfektion mit einem 70%igen ethanolhaltigen Desinfektionsmittel erfolgte der Zugang zum Bauchraum über eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba mittels einer feinen Präparierschere (*Abbildung 6A*). Anschließend wurde der Schnitt nach beiden Seiten kranial bis jeweils unter Leber und Milz erweitert. Danach wurde das gesamte Darmpaket durch einen Stieltupfer nach lateral luxiert, um eine freie Sicht und Zugangsmöglichkeit auf beide Uterushörner zu erlangen (*Abbildung 6B*). Diese wurden nun beidseits kaudal der Ovarien abgetrennt und das Mesometrium mit den zu- und abführenden Gefäßen sorgfältig abpräpariert.

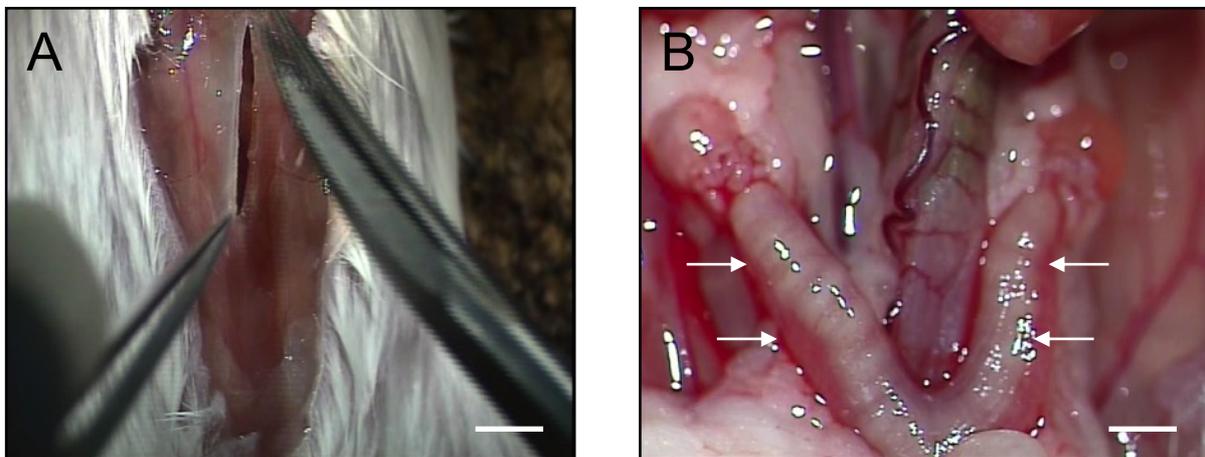


Abbildung 6: **A:** Eröffnung des Peritoneums über eine mediane Laparotomie. **B:** Aufsicht auf den Uterus mit beidseits freigelegten Uterushörnern (Pfeile) (Skalierung: A: 5 mm, B: 3,1 mm).

Schließlich wurden die Uterushörner nahe der Bifurkation abgesetzt und die so gewonnenen Präparate in eine Petrischale mit 37°C warmen *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; 10% fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) transferiert (*Abbildung 7A*). Die Spendertiere wurden anschließend mit einer Überdosis Narkosemittel getötet.

Unter stereomikroskopischer Kontrolle (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die Uterushörner vorsichtig mit einer Mikroschere longitudinal eröffnet und auf einer Korkplatte aufgespannt (*Abbildung 7B*). Mit einer 2mm-Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) wurde nachfolgend das gesamte Uteruspräparat durchstoßen, so dass je nach Größe der Uterushörner zwischen 8 und 10 Gewebestücke, bestehend aus Endometrium, Myometrium und Perimetrium, pro Maus gewonnen werden konnten (*Abbildung 7C*). Diese wurden in einer zweiten DMEM-gefüllten Petrischale gesammelt (*Abbildung 7D*).

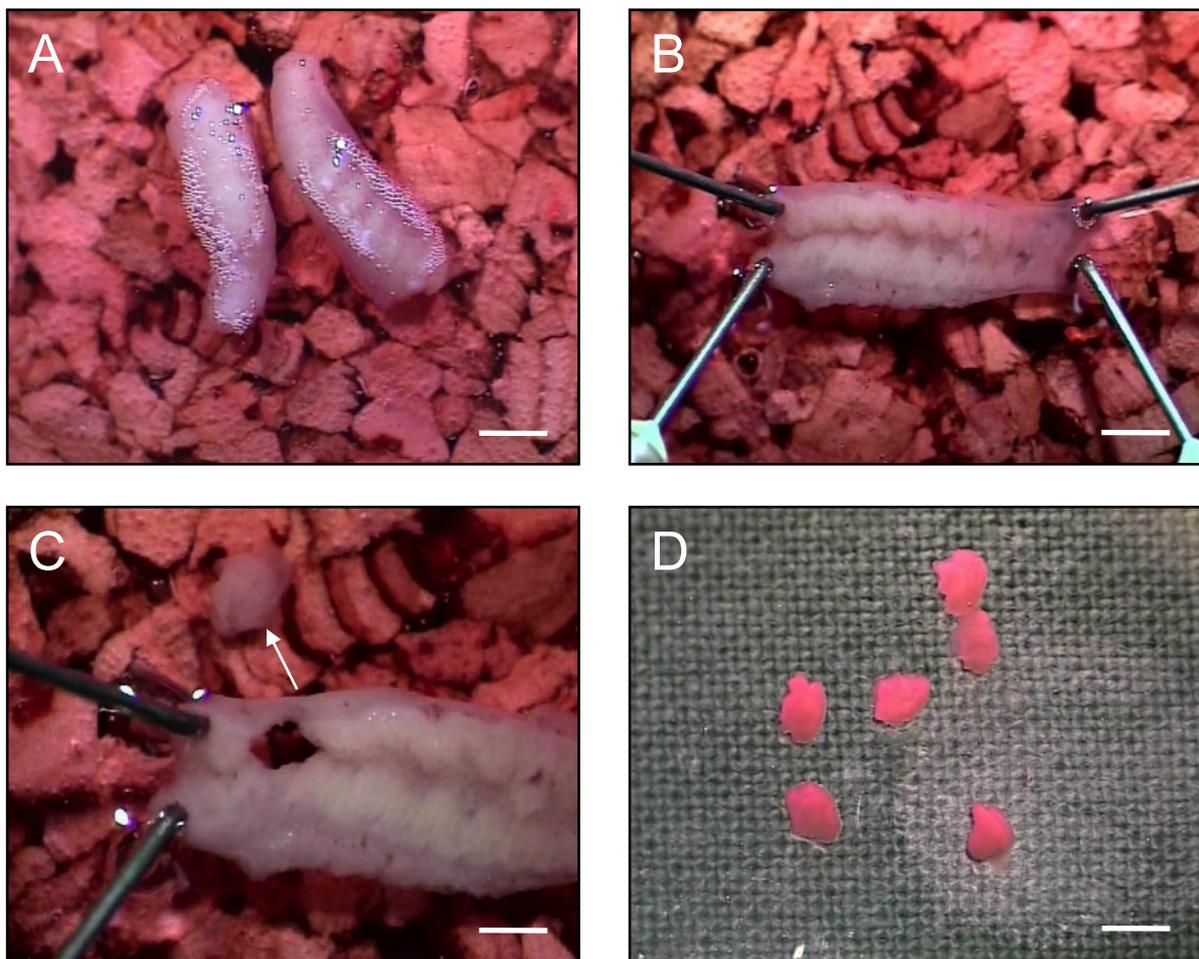


Abbildung 7: **A:** Beidseits entnommene Uterushörner. **B:** Uterushorn nach longitudinaler Eröffnung und Aufspannen auf Kork. **C:** Ausgestanztes 2mm-Fragment (Pfeil). **D:** Gesammelte Fragmente in der Petrischale (Skalierung: A,B,D: 3,1 mm, C: 2 mm).

5.3.3. Transplantation der Uterusfragmente

Für die syngene Transplantation der Uterusfragmente wurden die zuvor knochenmarktransplantierten Tie2-GFP-Mäuse (*siehe 5.2.*) durch intraperitoneale Injektion

von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und 2% Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun, Bayer) anästhesiert und in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion des Abdomens mit 70%igem Alkohol erfolgte der Zugang zum Bauchraum durch eine mediane Laparotomie entlang der Linea alba. Dabei wurde sorgfältig auf die Schonung der epigastrischen Gefäße entlang der Vorderwand der Peritonealhöhle geachtet, um stärkere Blutungen zu vermeiden. Auf jeder Seite wurde lateral der epigastrischen Gefäße jeweils ein Fragment kranial und kaudal mit einem 7-0 Polypropylen-Faden (Prolene; Ethicon Products, Norderstedt, Deutschland) und 2 gegenläufigen Knoten locker an der Bauchwand fixiert (*Abbildung 8A und B*), sodass in jedem Tier 4 Herde induziert wurden. Bezüglich der Stichrichtung wurde darauf geachtet, dass der Einstich in das Fragment vom Perimetrium her erfolgte, um eine direkte Adaptation zwischen Peritoneum und Endometrium zu gewährleisten. Nachfolgend wurde die Bauchhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung mehrfach gespült und die Operationswunde durch einen 5-0 Polypropylen-Faden (Prolene; Ethicon Products) in fortlaufender Naht verschlossen.

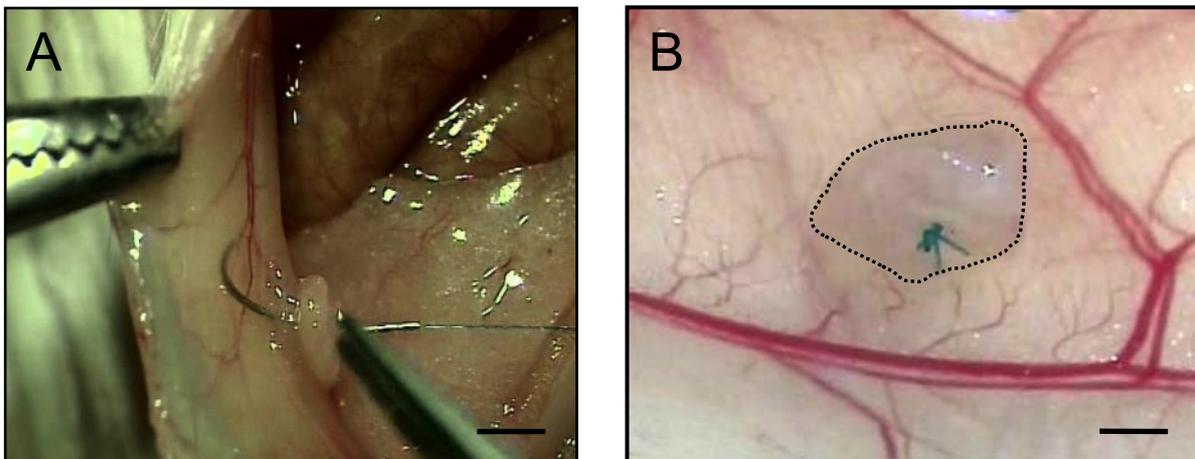


Abbildung 8: Transplantation der Uterusfragmente. **A:** Annäherung eines 2mm-Fragmentes an die laterale Bauchwand mit einem 7-0 Prolene-Faden. **B:** Übersichtsbild eines angenäherten Herdes (Begrenzung durch gepunktete Linie) (Skalierung: A: 3,1 mm, B: 1,3 mm).

5.4. INTRAVITALE FLUORESCENZMIKROSKOPIE

Die Vaskularisierung der induzierten Endometrioseherde wurde mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Mit dieser Technik ist es möglich, die Mik-

rozirkulation am lebenden Tier zu analysieren und somit verschiedene mikrohämodynamische Parameter zu erfassen.

Zur Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und 2% Xylazin (15 mg/kg KG; Rompun, Bayer) anästhesiert. Der Zugang zu den Endometrioseherden erfolgte wiederum durch eine mediane Laparotomie. Je nach untersuchtem Herd wurde das Tier entweder auf seiner rechten oder linken Seite auf einer Plexiglasbühne unter dem Mikroskop positioniert. Um die Herde vor dem Austrocknen zu schützen, wurden sie während des Mikroskopierens in regelmäßigen Abständen mit 37°C warmer PBS-Lösung benetzt. Zur Darstellung der Blutgefäße wurde den Versuchstieren 0,05 ml des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran (5%, Molekulargewicht 150.000 Da; Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland) retrobulbär injiziert, der aufgrund seines hohen Molekulargewichtes intravasal verbleibt und damit zur Kontrastierung des Blutplasmas genutzt werden kann.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines intravitalen Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss AxioTech Mikroskop; Zeiss, Oberkochen, Deutschland), welches zur Auflichtmikroskopie mit einer 100W-Quecksilberdampf Lampe und einem Filtersystem zur Anregung und Filterung des Lichts verschiedener Wellenlängen im Blau-, Grün- und UV-Bereich gekoppelt war. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer *charged coupled device* (CCD) Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen. Über einen Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan) zur genauen Dokumentation der Untersuchungsnummer und des Untersuchungsdatums wurden die Aufnahmen an einen DVD-Rekorder (R119; Samsung Electronics, Seoul, Südkorea) übertragen und zur offline-Analyse aufgezeichnet. Für Übersichtsaufnahmen der Endometrioseherde diente ein 5x-Objektiv (Zeiss). Für Detailaufnahmen wurden ein 10x- und ein 20x-Objektiv mit langem Arbeitsabstand verwendet (Zeiss). Insgesamt konnten so Vergrößerungen von x115, x230 und x460 auf einem Videomonitor (KV-14CT1E; Sony, Tokio, Japan) erreicht werden (*Abbildung 9*).

Am Ende der Untersuchung wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkose getötet, die Endometrioseherde vorsichtig exzidiert und für die späteren histologischen und immunhistochemischen Analysen fixiert.

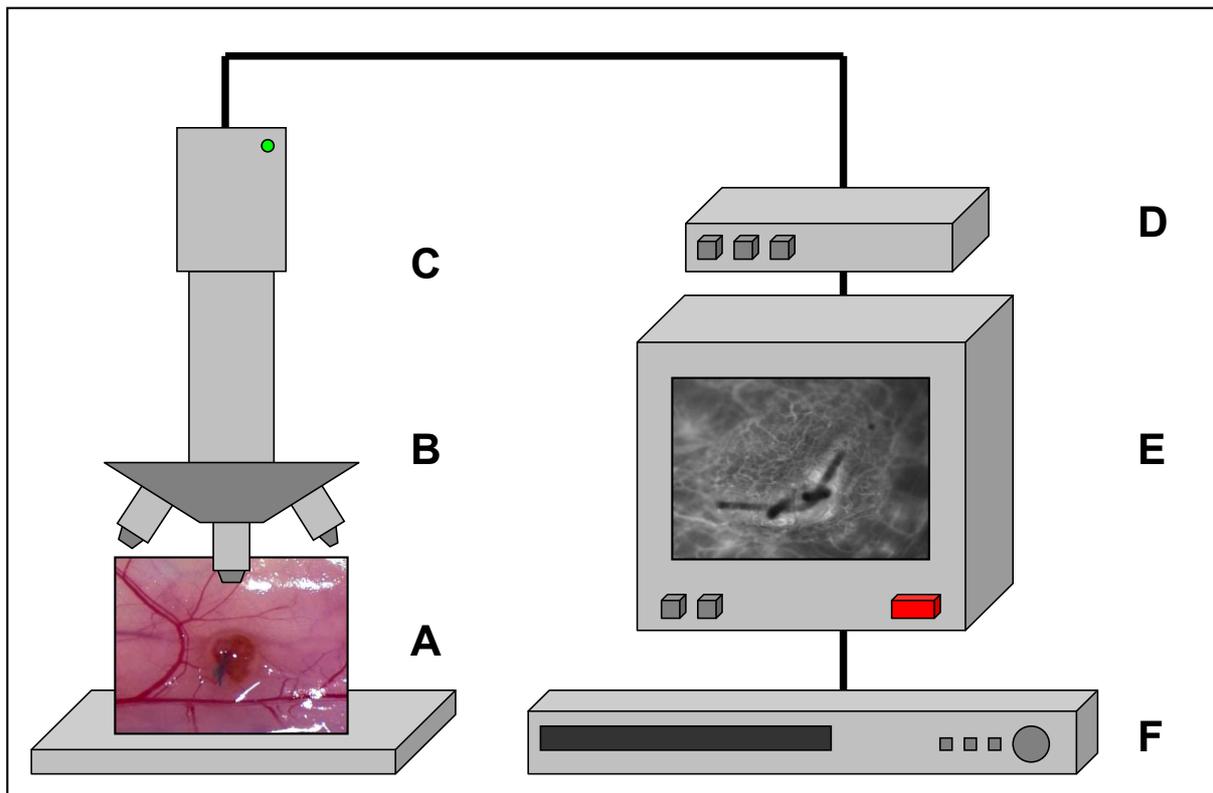


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Arbeitsplatzes zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie mit dem auf einer Plexiglasbühne gelagerten Versuchstier mit zu mikroskopierendem Endometrioseherd (A), Mikroskop (B), Videokamera (C), Videotimer (D), Monitor (E) und DVD-Rekorder (F).

Die quantitative Auswertung der auf DVD gespeicherten intravitalen fluoreszenzmikroskopischen Bilder erfolgte offline, d.h. nach Beendigung der Versuche, mittels eines computergestützten Bildverarbeitungssystems (CapImage; Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Zur Ermittlung des Anteils der perfundierten Endometrioseherde an allen analysierten Herden wurden Aufnahmen mit dem 5x- und 10x-Objektiv ausgewertet. Die Messung der funktionellen Kapillardichte neu entstandener Gefäße erfolgte auf Aufnahmen mit dem 10x-Objektiv. Sämtliche weiteren Parameter wie Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit wurden auf Detailaufnahmen mit dem 20x-Objektiv gemessen. Zur Auswertung wurden nur solche Endometrioseherde verwendet, die zum Analysezeitpunkt nicht mit Organen der Peritonealhöhle (wie z.B. Leber und Darm) verwachsen waren.

5.4.1. Anteil perfundierter Endometrioseherde

Um den Anteil perfundierter Endometrioseherde pro Zeitpunkt zu bestimmen, wurden sämtliche Herde mikroskopiert und als perfundiert gewertet, wenn sie während der

Untersuchung Gefäße mit einem deutlich sichtbaren Blutfluss aufwies. Pro Herd kam es dabei nicht auf die Anzahl der durchbluteten Gefäße an, sondern nur auf deren Vorhandensein. Das Ergebnis wurde dementsprechend als Anteil (in %) der in die Auswertung eingeschlossenen Endometrioseherde angegeben.

5.4.2. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte ist definiert als die Gesamtlänge aller perfundierter Gefäße in einem definierten Beobachtungsfeld. Zur Quantifizierung der funktionellen Kapillardichte wurde in verschiedenen Arealen eines perfundierten Herdes die Länge der durchbluteten Gefäße digital nachgezeichnet. Aus dem Quotient der nachgezeichneten Gefäße und der Fläche der Beobachtungsareale errechnet sich dann die funktionelle Kapillardichte (in cm/cm²).

5.4.3. Gefäßdurchmesser

Zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers (in μm) wurden zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten 10 Gefäße pro Herd ausgewählt und deren Durchmesser durch Markierung zweier gegenüberliegender Punkte auf den Gefäßwänden gemessen. Die Auswahl der Gefäße erfolgte standardisiert mittels einer mit einem Achsenkreuz markierten Folie, welche über den Auswertungsmonitor gelegt wurde. Es wurde nur der Durchmesser der Gefäße gemessen, die entweder die vertikale oder die horizontale Linie des Achsenkreuzes schnitten. Aus diesen 10 Werten wurde der Mittelwert gebildet.

5.4.4. Blutzellgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte nach Applikation von FITC-Dextran an den gleichen Gefäßen, an denen zuvor bereits der Gefäßdurchmesser bestimmt wurde. Hierzu wurde die computerbasierte Line-Shift-Methode angewendet [KLYSCZ *et al.*, 1997]. Hierfür musste zunächst mittig in das Lumen des gewählten Gefäßes eine Linie parallel zur Gefäßwand und zur Flussrichtung digital eingezeichnet und die mikroskopische Aufzeichnung für 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt werden. Anhand der Bewegungsprofile der Erythrozyten, welche sich entlang der Linie bewegten, erstellte der Computer ein Grauwertprofil im Sinne eines Line-Shift-Diagramms mit hellen und dunklen schräg verlaufenden Linien. Aus der Steigung dieser Linien konnte die Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ berechnet werden.

5.4.5. Mikrovaskulärer Blutfluss

Aus dem Gefäßdurchmesser (d) und der Blutzellgeschwindigkeit (v) konnte der mikrovaskuläre Blutfluss anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Mikrovaskulärer Blutfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times v/K$$

K steht in dieser Formel für den Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor, der die Fließgeschwindigkeitsunterschiede innerhalb des Gefäßlumens abhängig von der Lokalisation zur Gefäßwand berücksichtigt [BAKER und WAYLAND, 1974]. Er gleicht die Diskrepanz zwischen der Fließgeschwindigkeit des Zentralstroms und der durchschnittlichen Blutfließgeschwindigkeit aus. Entsprechend der gemessenen Gefäßdurchmesser konnte der Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor hier auf 1,3 festgesetzt werden [LIPOWSKY und ZWEIFACH, 1978].

5.4.6. Scherrate

Die Scherrate ist ein Maß für die Blutzellgeschwindigkeit entlang der Gefäßwand im Verhältnis zur Blutzellgeschwindigkeit in der Gefäßmitte. In physiologischen realen Flüssigkeiten herrschen aufgrund von Reibungsverlusten und Turbulenzen in Gefäßwandnähe unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten je nach Messpunkt innerhalb des Gefäßlumens. Die Scherrate (y) kann durch folgende Gleichung aus dem Gefäßdurchmesser (d) und der Fließgeschwindigkeit (v) in der Gefäßmitte berechnet werden:

$$y = 8 \times v/d$$

5.5. OBERFLÄCHE DER ENDOMETRIOSEHERDE

Die Oberflächenmessung der Endometrioseherde wurde kurz vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde jeder Herd mit einer digitalen Schieblehre (Brüder Mannesmann Werkzeuge AG, Remscheid, Deutschland) vermessen. Unter operationsmikroskopischer Sicht (M651; Leica Microsystems GmbH) wurden die Herde in zwei senkrecht zu einander stehenden Diametern (D1

und D2) vermessen, ohne durch Druck oder Verschiebung mit der Schieblehre die Konformation der Herde zu ändern. Die Messwerte konnten am digitalen Display der Schieblehre abgelesen werden. Die Oberfläche der Herde (in mm²) wurde mit Hilfe der Oberflächenformel für Ellipsen ($D1 \times D2 \times \pi / 4$) bestimmt [BECKER *et al.*, 2006].

5.6. HISTOLOGIE

5.6.1. Konventionelle Histologie

Am Ende der *in vivo* Experimente wurden pro Versuchstier jeweils 2 der exzidierten Endometrioseherde in 4%-igem Formalin für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Nach Einbettung in Paraffin konnten Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt und mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Standardprotokoll gefärbt werden. Hämatoxylin färbt dabei bevorzugt alle sauren bzw. basophilen Strukturen (Zellkern, DNA, endoplasmatisches Retikulum) blau, wohingegen Eosin als saurer Farbstoff alle azidophilen bzw. eosinophilen Strukturen (v.a. Zellplasmabestandteile) rot markiert. Die mikroskopische Untersuchung der Schnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop (BX60; Olympus).

5.6.2. Immunhistochemie

Zusätzlich zur Formalinfixierung für die konventionelle Histologie wurden pro Versuchstier die restlichen beiden Endometrioseherde für immunhistochemische Untersuchungen in Tissue TEK (R. Jung GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei –80°C aufbewahrt. Mithilfe eines Kryostats (Leica, Nussloch, Deutschland) wurden Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt.

Zur Darstellung GFP-positiver Zellen in den Endometrioseherden wurde ein aus Kaninchen gewonnener polyklonaler anti-GFP-Antikörper (1:200; Abcam, Cambridge, Großbritannien) als primärer Antikörper eingesetzt. Ein aus Ziegen gewonnener Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper (1:200; Jackson, Suffolk, Großbritannien) diente als sekundärer Antikörper.

SDF-1 exprimierende Zellen konnten unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-anti-SDF-1-Antikörpers (1:25; Abcam) als primärer Antikörper und eines Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:100; Jackson) als sekundärer Antikörper markiert werden. Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion verwendet. Nach Gegenfärbung mit 1%-igem Methylgrün konnten die Schnitte lichtmikroskopisch untersucht werden (BX60; Olympus).

Für weitere immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden die Kryoschnitte mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus-Antikörper gegen CD31 (1:25; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) angefärbt, um Endothelzellen innerhalb der Endometrioseherde sichtbar zu machen. Ein Cyanin 3 (Cy3)-markierter Ziege-anti-Ratte-Antikörper (1:600; dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) diente als Sekundärantikörper.

Zur Darstellung von EPCs wurden zusätzliche Schnitte mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus-Antikörper gegen CD34 (1:30; Abcam) und einem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper gegen VEGFR-2 (1:20; Abcam) angefärbt. Als Sekundärantikörper wurden ein Ziege-anti-Ratte-Cy3-Antikörper (1:600; dianova GmbH) und ein mit Biotin markierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:15; Jackson), der mittels Fluorescein-markiertem Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, Kanada) nachgewiesen werden konnte, verwendet. Weiterhin wurden die Präparate wie oben beschrieben mit einem Antikörper gegen CD31 und einem monoklonalen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper gegen GFP (1:200; Abcam) angefärbt. Ein Biotin-markierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:15; Jackson, Suffolk), der mittels Fluorescein-markiertem Streptavidin (1:50; Vector Labs, Burlingame, Kanada) nachgewiesen werden konnte, diente als sekundärer Antikörper.

Die Zellkerne in jedem Schnittpräparat wurden mit Hoechst 33342 (1:500; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan).

Die quantitativen Analysen der immunhistochemischen Schnitte beinhalteten die folgenden Parameter:

5.6.2.1. Dichte CD31-positiver Gefäße

Um die Dichte CD31-positiver Mikrogefäße innerhalb der Endometrioseherde im Zeitverlauf zu bestimmen, wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt 4 kryokonservierte Endometrioseherde ausgewählt, von denen wiederum 3 repräsentative Schnittpräparate aus dem mittleren Bereich der Herde analysiert wurden. Hierzu wurde die Gesamtzahl aller CD31-positiven Gefäße innerhalb der Herde gezählt und in Relation zur Gesamtfläche der einzelnen Herde gesetzt (Gefäße pro mm²).

5.6.2.2. Anteil GFP-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl

Nach entsprechender immunhistochemischer Färbung von 4 Herden pro Untersuchungszeitpunkt wurden zur Bestimmung der Anzahl GFP-positiver Zellen innerhalb der Endometrioseherde 3 repräsentative Schnitte aus dem mittleren Bereich der Herde ausgewählt. Pro Schnitt wurden in je 10 standardisierten Gesichtsfeldern die Gesamtanzahl aller Zellen und die Zahl der GFP-positiven Zellen bestimmt. Dabei wurde differenziert, ob die GFP-positiven Zellen in das Endothel von Gefäßen integriert oder im umgebenden Stromagewebe lokalisiert waren.

5.6.2.3. Anteil GFP-positiver Zellen an allen Endothelzellen

Zur Bestimmung des Anteils GFP-positiver Zellen an allen Endothelzellen innerhalb eines Endometrioseherdes wurden 4 Herde pro Untersuchungszeitpunkt ausgewählt. Nach entsprechender immunhistochemischer Färbung (GFP/CD31) wurden in 3 repräsentativen Schnitten aus dem mittleren Bereich der Herde alle Endothelzellen und alle GFP-positiven Endothelzellen gezählt. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde in Prozent aller Endothelzellen angegeben.

5.6.2.4. Anteil SDF-1-positiver Zellen

Um den Anteil SDF-1-positiver Zellen zu bestimmen, wurden 4 Endometrioseherde pro Untersuchungszeitpunkt ausgewählt. In je einem repräsentativen Schnitt wurde in je 10 standardisierten Gesichtsfeldern die Gesamtzahl aller Zellen und die Anzahl SDF-1-positiver Zellen gezählt. Der Anteil der SDF-1-positiven Zellen wurde in Prozent aller Zellen angegeben.

5.7. DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Sie beruht auf der Detektion von charakteristischen Fluoreszenz- und Streumustern, die nach Kopplung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern und Anregung durch Laserlicht von der zu untersuchenden Einzelzellsuspension emittiert werden [MANDY *et al.*, 1995].

Um zu analysieren, ob die Induktion der Endometrioseherde die Anzahl zirkulierender EPCs im peripheren Blut oder in hämatopoetischen Organen der Maus (z.B. Knochenmark und Milz) erhöht, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Endometrioseherde wie unter 5.3. beschrieben in zusätzlichen C57BL/6-Mäusen induziert. Weitere Versuchstiere wurden als Sham-Tiere operiert, in denen über eine identische mediane Laparotomie lediglich ein 7-0 Polypropylene-Faden (Prolene; Ethicon Products) ohne Uterusgewebe an die laterale Bauchwand fixiert wurde. Eine Gruppe unbehandelter Mäuse diente als Kontrollgruppe.

An den Tagen 3 und 14 nach Operation wurde den Versuchstieren Vollblut, Knochenmark und Milz entnommen. Anschließend erfolgte die Aufbereitung des Blutes und des Gewebes mittels 40 µm Cell Strainer (BD Biosciences), Zentrifugation und Waschung mit FACS-Puffer (500 ml PBS, 25 ml gefiltertes *fetal calf serum* [FCS], 2,5 g *bovine serum albumin* [BSA]). Nach Lyse der Zellsuspension und F_c-Blockade (CD16/CD32, BD Pharmingen) wurden die überstehenden Lymphozytenpopulationen hinsichtlich ihrer Expression der EPC-Marker Sca-1-Fluorescein-Isothiocyanat (BD Pharmingen) und VEGFR-2-Phycoerythrin (BD Pharmingen) untersucht. Identische isotypische Antikörper dienten als Kontrolle (rat IgG2a_κ; BD Pharmingen). Mit einem FACScan (BD Pharmingen) wurden zweifarbige durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt und die gewonnenen Daten mittels Computersoftware (CellQuest; BD Pharmingen) verarbeitet.

5.8. EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

In 20 knochenmarktransplantierten FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato-Mäusen wurden insgesamt 80 Endometrioseherde induziert. Nach 3, 7, 14 und 28 Tagen wurden je 20 Endometrioseherde von 5 Versuchstieren mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In 4 Herden pro Untersuchungszeitpunkt wurden mittels immunhistochemischer Untersuchungen der Anteil SDF-1-positiver und GFP-positiver Zellen und die Dichte der CD31-positiven Gefäße bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden insgesamt 48 Endometrioseherde in 12 knochenmarktransplantierten FVB/N-TgN (Tie2/GFP) 287 Sato-Mäusen induziert. Die Hälfte dieser Tiere wurde täglich mit dem SDF-1/CXCR4-Antagonisten AMD3100 (n=6; 5 mg/kg KG gelöst in 100 µl PBS; Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) durch subkutane Injektion behandelt. Als Kontrollgruppe dienen die übrigen 6 Tiere, denen lediglich die wirkstofflose Trägerlösung subkutan injiziert wurde (n=6; 100 µl PBS). Nach 14 Tagen wurden durch intravitalfluoreszenzmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen die funktionelle Kapillardichte und die Anzahl GFP-positiver Endothelzellen in den Endometrioseherden bestimmt.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden insgesamt 64 Endometrioseherde in 16 C57BL/6-Mäusen induziert. An den Tagen 3 und 14 wurde den Versuchstieren Vollblut, Knochenmark und Milz entnommen und die Anzahl Sca-1/VEGFR-2-positiver EPCs mittels durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. Sham-operierte (n=16) und unbehandelte Versuchstiere (n=8) dienten als Kontrolle.

5.9. STATISTIK

Sämtliche Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter an den jeweiligen Untersuchungstagen aus den Einzelwerten, welche in den jeweiligen Untersuchungsfeldern gemessen wurden.

Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen zwei Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels *Student's t-Test* für den unverbundenen Paarvergleich.

Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mit einer *One way analysis of variance* (ANOVA) gefolgt von einem post hoc-Test, der eine Korrektur des α -Fehlers nach *Bonferroni* beinhaltet. Um wiederholte Messungen in einer Gruppe zu vergleichen, wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen gefolgt vom *Student-Newman-Keuls-Test* durchgeführt.

Sämtliche statistischen Auswertungen erfolgten unter Verwendung der Software SigmaPlot (Version 11.0; Systat Software, Chicago, Illinois, USA). Als statistisch signifikant wurden Unterschiede der Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angesehen.

6. ERGEBNISSE

6.1. MORPHOLOGIE DER ENDOMETRIOSEHERDE

6.1.1. Oberfläche

Wie in 5.5. beschrieben, wurden die transplantierten Gewebefragmente zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten mittels einer digitalen Schieblehre in zwei Ebenen vermessen, um eine Abschätzung zur Größenentwicklung im Verlauf vornehmen zu können.

Die Fragmente hatten zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten eine durchschnittliche Größe von 2,19 mm² (Tag 3), 1,85 mm² (Tag 7), 1,73 mm² (Tag 14) und 1,44 mm² (Tag 28). Dies entspricht einer signifikanten Abnahme der Oberfläche der Endometrioseherde an Tag 28 im Vergleich den übrigen Untersuchungszeitpunkten (*Tabelle 1*).

	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 28
Oberfläche (mm ²)	2,19 ± 0,04	1,85 ± 0,19 *	1,73 ± 0,16 *	1,44 ± 0,17 #

Tabelle 1: Oberfläche (mm²) der transplantierten Gewebefragmente an den Tagen 3, 7, 14 und 28. Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 versus Tag 3, #P < 0,05 versus Tag 3, 7 und 14.

6.1.2. Makro- und mikroskopische Veränderungen

Nachdem die Gewebefragmente an die laterale Bauchwand der Versuchstiere fixiert wurden, waren im Verlauf des Beobachtungszeitraumes weitere makro- bzw. mikroskopische Veränderungen an den sich entwickelnden Endometrioseherden nachweisbar.

An Tag 3 erschienen die transplantierten Fragmente noch durchgehend blass als Zeichen fehlender Vaskularisierung. Lediglich eine Rötung im Bereich des angrenzenden Peritoneums als Zeichen einer frühen angiogenen Reaktion war erkennbar (*Abbildung 10A*). Am 7. Tag waren die Herde selbst hingegen durch eine ubiquitäre rötliche Verfärbung gekennzeichnet (*Abbildung 10B*). Diese ist als Folge lokaler Gewebeeinblutungen zu werten. Erst nach 14 bzw. 28 Tagen konnte man bereits makroskopisch eine deutlich erkennbare Gefäßzeichnung sowohl in der Peripherie

als auch im Zentrum der Herde erkennen (*Abbildung 10C*). Zu diesen Zeitpunkten war auch mikroskopisch anhand durchgeführter HE-Färbungen die typische Histomorphologie von Endometrioseherden nachweisbar. Diese war gekennzeichnet durch zystisch dilatierte Drüsen mit auskleidendem Drüsenepithel, welche von einem gut vaskularisierten endometrialem Stromagewebe umgeben waren (*Abbildung 10D*).

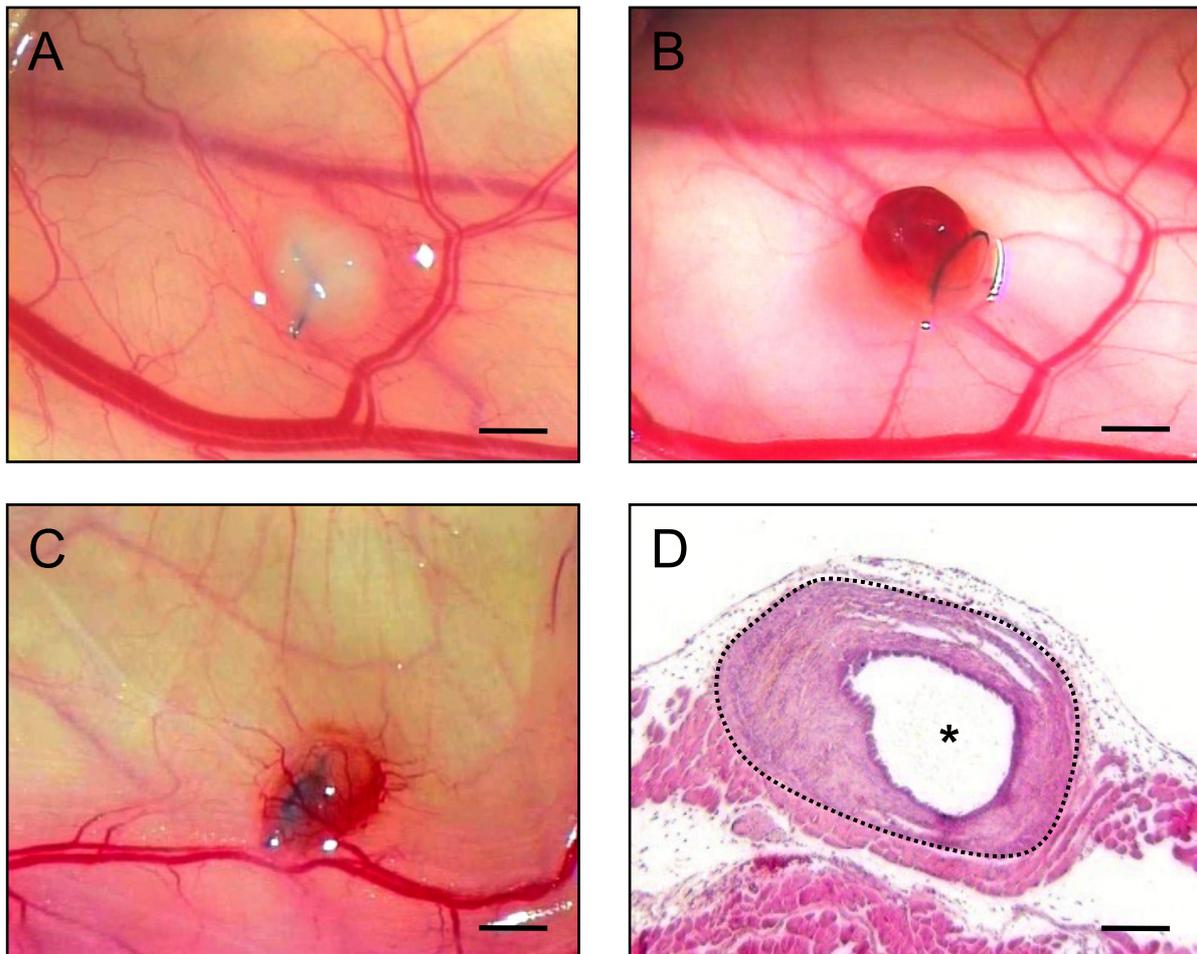


Abbildung 10: **A:** Abgeblasstes ischämisches Gewebefragment mit lokaler Rötung des umliegenden Gewebes an Tag 3. **B:** Rötlich verfärbter Endometrioseherd an Tag 7. **C:** Vollständig ausgebildeter Endometrioseherd mit ausgeprägter Vaskularisierung an Tag 28. **D:** HE-gefärbter Schnitt durch einen Endometrioseherd an Tag 28 (Begrenzung durch gepunktete Linie) mit zystisch dilatierter Drüse (Sternchen) und umgebendem Stromagewebe (Skalierung: A-C: 1,3 mm, D: 200 µm).

6.2. VASKULARISIERUNG DER ENDOMETRIOSEHERDE

6.2.1. Mikrovaskuläres Netzwerk

6.2.1.1. Anteil perfundierter Endometrioseherde

Am 3. Tag nach Transplantation der Gewebefragmente konnte keine Vaskularisierung nachgewiesen werden (*Abbildung 11A*). Erst ab dem 7. Tag war ein Teil der sich entwickelnden Endometrioseherde durch die partielle Ausbildung eines Gefäßnetzes gekennzeichnet.

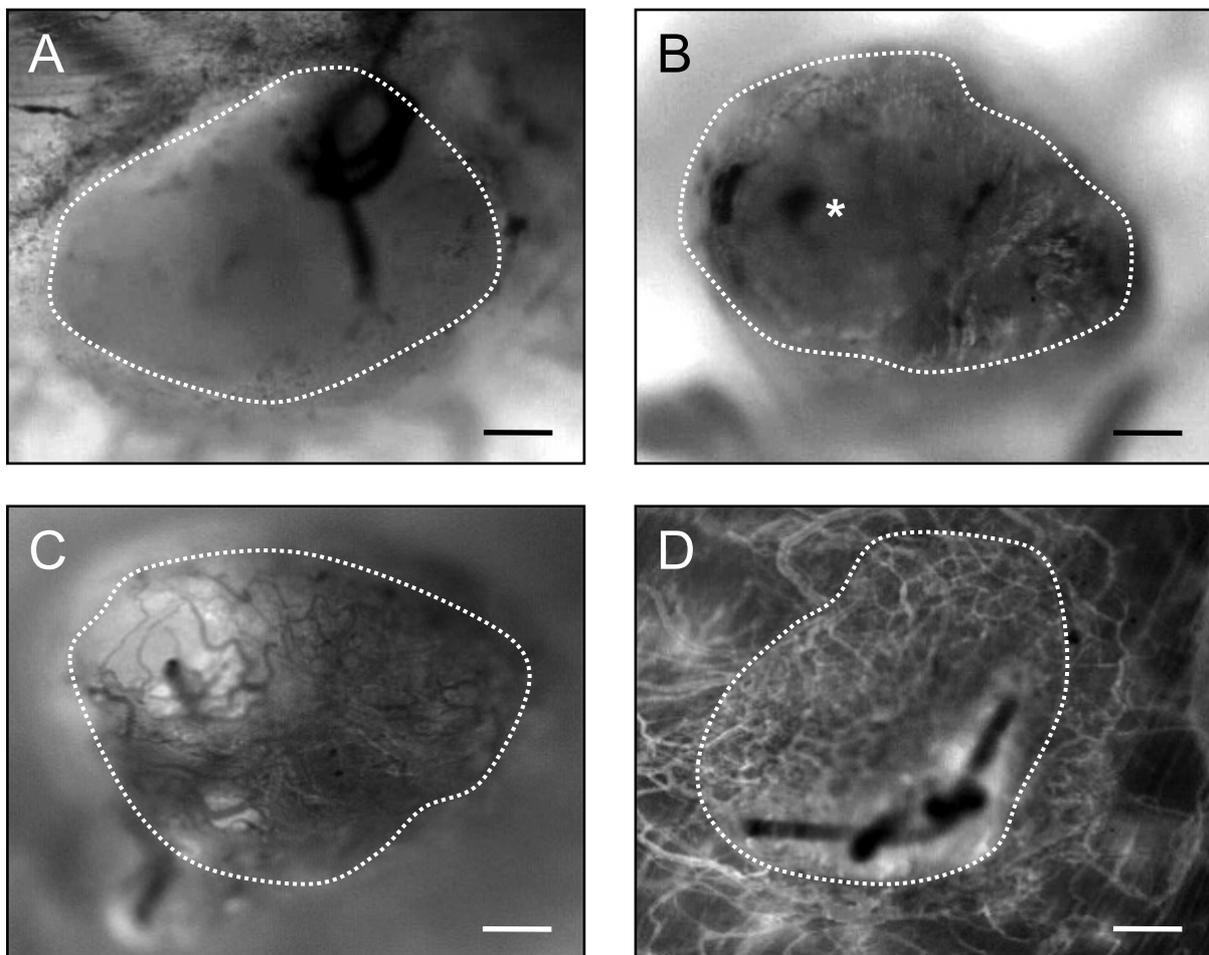


Abbildung 11: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Endometrioseherde (Begrenzung durch gepunktete Linie) an Tag 3 (A), 7 (B), 14 (C) und 28 (D) nach Fixation von Uterusgewebe aus FVB/N-Mäusen an die laterale Bauchwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen. An Tag 3 sind noch keine Mikrogefäße vorhanden (A). Nach 7 Tagen lassen sich in einigen Bereichen der Herde zahlreiche durchblutete Gefäße nachweisen, während andere Bereiche noch nicht perfundiert sind (B, Sternchen). Die Endometrioseherde an Tag 14 und 28 weisen ein gut ausgebildetes mikrovaskuläres Netzwerk auf (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination) (Skalierung: A-D: 250 μ m).

Zentrale Areale blieben dabei noch ohne Perfusion (*Abbildung 11B*). An den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten war ein vollständiges dichtes mikrovaskuläres Netzwerk in allen Arealen der Herde nachweisbar (*Abbildung 11 C und D*).

Weiterhin zeigte die quantitative Analyse der Anzahl perfundierter Herde, dass an Tag 3 keiner der sich entwickelnden Endometrioseherde eine Perfusion aufwies. An Tag 7 hingegen war in 50% der untersuchten Herde eine Vaskularisierung vorhanden. Ab dem 14. Tag waren nahezu alle Endometrioseherde vollständig durch ein neugebildetes dichtes Gefäßnetzwerk gekennzeichnet (*Abbildung 12*).

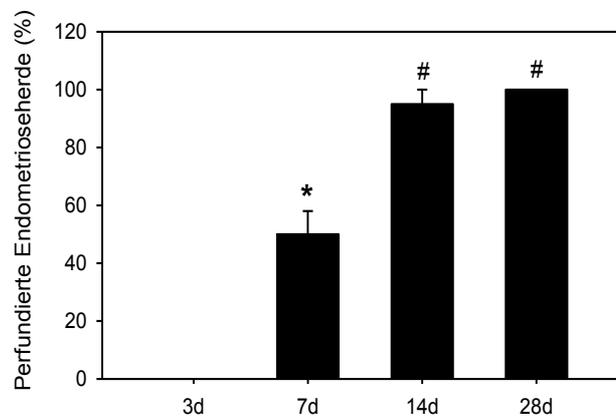


Abbildung 12: Anteil perfundierter Endometrioseherde (%) an den Tagen 3, 7, 14 und 28. * $P < 0,05$ versus Tag 3, # $P < 0,05$ versus Tag 3 und 7.

6.2.1.2. Funktionelle Kapillardichte

Über den Untersuchungszeitraum von 4 Wochen nahm die funktionelle Kapillardichte innerhalb der Endometrioseherde stetig bis zu einem Maximum von 302 cm/cm² an Tag 28 zu. Entsprechend war die funktionelle Kapillardichte an den beiden letzten Untersuchungszeitpunkten nach 14 und 28 Tagen im Vergleich zu den Tagen 3 und 7 signifikant erhöht (*Abbildung 13*).

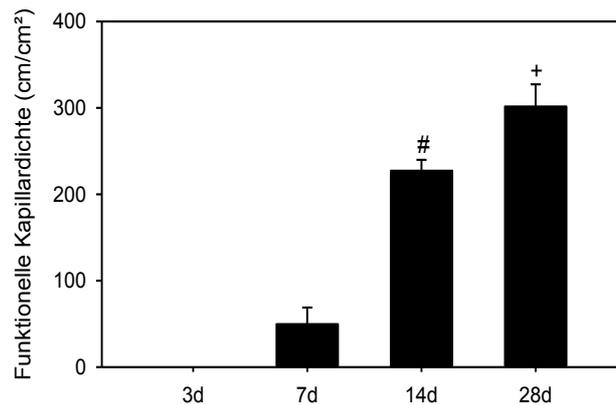


Abbildung 13: Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) der Endometrioseherde an den Tagen 3, 7, 14 und 28 nach Fixation von Uterusgewebe an die laterale Bauchwand der Versuchstiere. Mittelwerte ± SEM. [#]P < 0,05 versus Tag 3 und 7, ⁺P < 0,05 versus Tag 3, 7 und 14.

6.2.2. Mikrohämodynamik

Mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie war es auch möglich, mikrohämodynamische Parameter in den Endometrioseherden zu messen. Da die Herde am 3. Tag noch keine perfundierten Gefäße enthielten, wurden diese erst ab dem 7. Tag analysiert.

Der Durchmesser neugebildeter Gefäße innerhalb der Herde lag während des Untersuchungszeitraumes zwischen 23,9 µm an Tag 7 und 26,9 µm an Tag 28 ohne signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten (*Tabelle 2*).

Die Blutzellgeschwindigkeit innerhalb der gemessenen Gefäße stieg hingegen deutlich von 177,8 µm/s (Tag 7) auf 419,6 µm/s (Tag 28) an (*Tabelle 2*).

Die Scherrate betrug 60,9 s⁻¹ an Tag 7 und verdoppelte sich an Tag 28 auf 127,7 s⁻¹. Der mikrovaskuläre Blutfluss an Tag 28 war mit 194,7 pl/s gegenüber den Werten an den übrigen Untersuchungszeitpunkten signifikant erhöht (*Tabelle 2*).

	Tag 7	Tag 14	Tag 28
Gefäßdurchmesser (µm)	23,9 ± 1,1	24,5 ± 1,9	26,9 ± 1,6
Blutzellgeschwindigkeit (µm/s)	177,8 ± 36,9	344,2 ± 97,6	419,6 ± 40,2
Mikrovaskulärer Blutfluss (pl/s)	60,5 ± 13,3	119,6 ± 18,8	194,7 ± 33,3*
Scherrate (s ⁻¹)	60,9 ± 12,4	121,5 ± 42,9	127,7 ± 13,8

Tabelle 2: Mikrozirkulatorische Parameter an den Tagen 7, 14 und 28 nach Fixation von Uterusgewebe aus FVB/N-Mäusen an die laterale Peritonealwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen. Mittelwerte ± SEM. *P < 0,05 versus Tag 7 und 14.

6.2.3. Gefäßdichte

Zusätzliche immunhistochemische Untersuchungen CD31-gefärbter Schnitte zeigten, dass frisch isoliertes Endometriumgewebe eine hohe Gefäßdichte von 240 mm^{-2} aufwies (Abbildung 14 A und F).

Bereits am 3. Tag nach Transplantation der Uterusfragmente an die laterale Bauchwand waren kaum noch CD31-positive Gefäße innerhalb der induzierten Endometrioseherde nachweisbar. Dies spricht für einen raschen Verlust CD31-positiver Endothelzellen innerhalb der frühen Phase der Entwicklung der Herde (Abbildung 14 B und F).

Im weiteren experimentellen Verlauf nahm aufgrund des Einwachsens neugebildeter Blutgefäße aus dem umgebenden Empfängergewebe die Anzahl CD31-positiver Gefäße innerhalb der Endometrioseherde wieder kontinuierlich zu. Daraus resultierte eine Gefäßdichte von 300 mm^{-2} an Tag 28 (Abbildung 14 C-F).

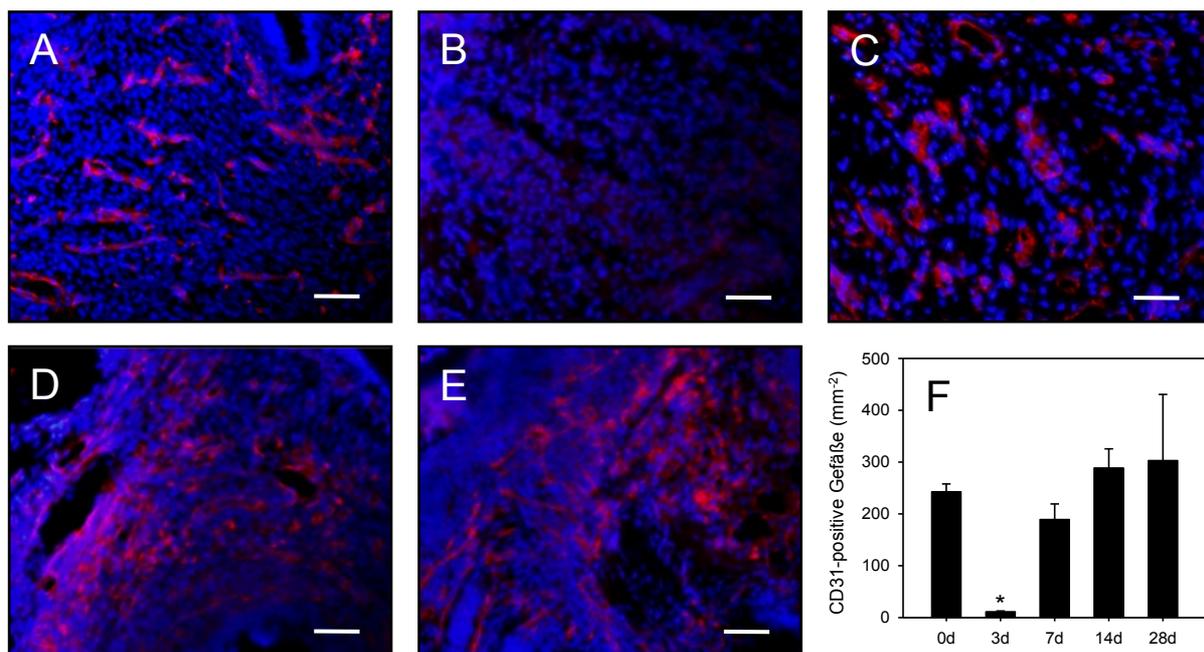


Abbildung 14: A-E: Immunhistochemische Darstellung von Mikrogefäßen in uterinem Gewebe direkt vor (A) sowie an Tag 3 (B), 7 (C), 14 (D) und 28 (E) nach Fixation an die Bauchwand. Die Schnitte wurden mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (blau) und mit einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung der Endothelzellen gefärbt (rot) (Skalierung: A-E: $50 \mu\text{m}$). F: Gefäßdichte direkt vor (Tag 0) sowie an Tag 3, 7, 14 und 28 nach Transplantation von Uterusfragmenten an die Bauchwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen. Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0,05$ versus Tag 0, 7, 14 und 28.

6.3. REKRUTIERUNG VON EPCs IN ENDOMETRIOSEHERDE

6.3.1. Anteil GFP-positiver Zellen

Die histologischen Untersuchungen des transplantierten Uterusgewebes ergaben, dass sich das Gewebe zu typischen Endometrioseherden mit zystisch dilatierten Drüsen und einem umgebenden vaskularisierten Stromagewebe entwickelten.

Am 3. Tag nach Transplantation, an dem noch keiner der untersuchten Herde eine Blutperfusion aufwies, konnten auch keine GFP-positive Zellen in dem Gewebe nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf zwischen den Tagen 7 und 28 waren hingegen ca. 1% aller Zellen innerhalb der Endometrioseherde GFP-positiv (*Tabelle 3*).

6.3.2. Lokalisation GFP-positiver Zellen innerhalb der Herde

Die genauere Analyse der Lokalisation GFP-positiver Zellen innerhalb der Endometrioseherde zeigte, dass durchschnittlich ca. 95% der Zellen in das Endothel der Gefäße integriert waren (*Tabelle 3, Abbildung 15*), wohingegen sich die übrigen 5% der Zellen unregelmäßig im umliegenden Stromagewebe verteilten (*Tabelle 3*).

	Gesamtzellzahl pro Herd	rekrutierte GFP-positive Zellen					
		im Herd insgesamt		im Gefäßendothel		im Stromagewebe	
		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Tag 3	3541 ± 360	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Tag 7	8451 ± 525	9,0 ± 1,1	1,1 ± 0,1	8,4 ± 1,1	93,8 ± 2,7	0,6 ± 0,3	6,2 ± 2,7
Tag 14	8509 ± 827	6,3 ± 1,2	0,7 ± 0,1	6,1 ± 1,1	95,8 ± 2,8	0,3 ± 0,1	4,2 ± 2,8
Tag 28	6320 ± 959	7,4 ± 1,6	1,6 ± 0,5	7,3 ± 1,7	96,4 ± 3,6	0,2 ± 0,2	3,6 ± 3,6

Tabelle 3: Anteil GFP-positiver Zellen an der durchschnittlichen Gesamtzellzahl der Endometrioseherde und deren Aufschlüsselung in GFP-positive Zellen des Gefäßendothels und GFP-positive Zellen im umliegenden Stromagewebe. Mittelwerte ± SEM.

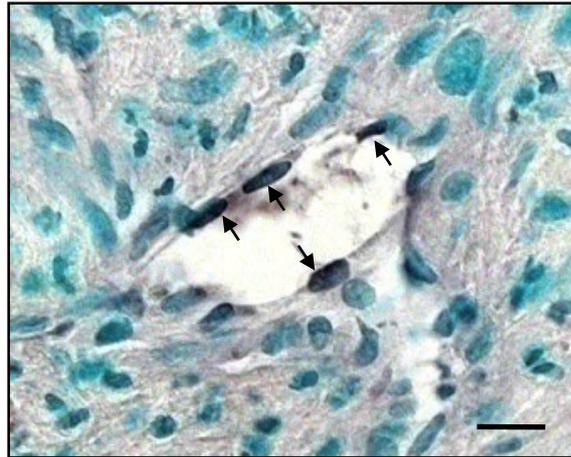


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis GFP-positiver Zellen (Pfeile) im Endothel eines Gefäßes in einem Endometrioseherd an Tag 28 (Skalierung: 8 µm).

6.3.3. Anteil GFP-positiver Endothelzellen

In quantitativen Analysen wurde die Anzahl GFP-positiver Gefäßendothelzellen innerhalb der Endometrioseherde bestimmt. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass diese Zellen doppelt positiv für GFP und CD31 waren (*Abbildung 16*). Dies belegt, dass es sich bei diesen Zellen um EPCs aus dem transplantierten Knochenmark von Tie2-GFP-Mäusen handeln muss und diese Zellen als Endothelzellen am Aufbau eines mikrovaskulären Netzwerkes in den sich entwickelnden Endometrioseherden beteiligt waren.

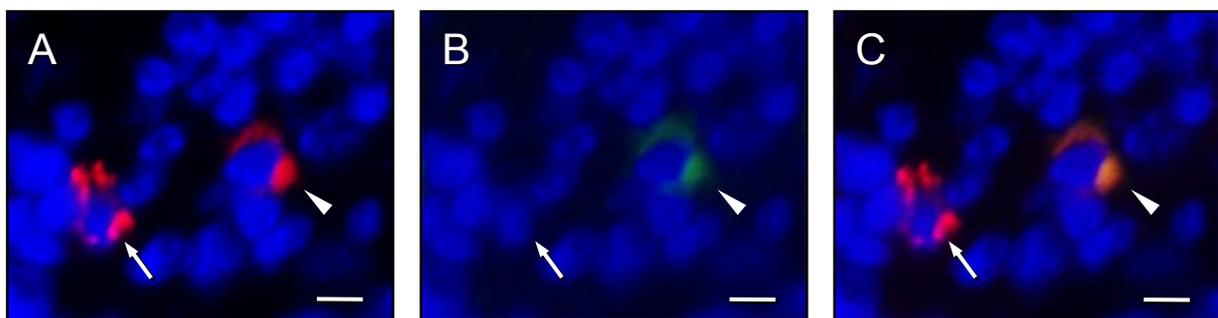


Abbildung 16: Immunfluoreszenzmikroskopische Detailaufnahme von Zellen eines Endometrioseherds an Tag 14 nach Transplantation eines Uterusfragments einer FVB/N-Maus an die laterale Bauchwand einer Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Maus. Die Schnitte wurden mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (A bis C, blau) und mit einem Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (A und C, rot) sowie einem Antikörper gegen GFP (B und C, grün) gefärbt. C entspricht der Überlagerung von A und B. Es ist eine EPC, welche doppelt positiv für CD31 und GFP ist (Pfeilspitzen), neben einer CD31-positiven Endothelzelle (Pfeile) zu sehen (Skalierung: 7 µm).

Interessanterweise waren an Tag 7 nach Endometrioseinduktion ca. 18% aller Endothelzellen GFP-positiv. Zu den folgenden Untersuchungszeitpunkten sank der Anteil GFP-positiver Endothelzellen langsam auf ca. 13% an Tag 28 ab (*Abbildung 17*).

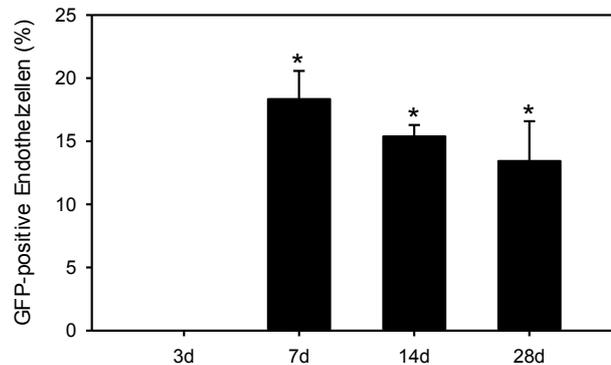


Abbildung 17: Anteil GFP-positiver Endothelzellen (in %) des Gefäßnetzwerkes innerhalb der Endometrioseherde an den Tagen 3, 7, 14 und 28 nach Fixation von Uterusgewebe aus FVB/N-Mäusen an die laterale Bauchwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ versus Tag 3.

6.3.4. Nachweis CD34/VEGFR-2-positiver EPCs

Zusätzlich zu zirkulierenden EPCs aus dem Knochenmark könnten im Modell der peritonealen Endometriose EPCs, welche sich bereits vor Transplantation im frisch isolierten Uterusgewebe befinden, zur Vaskularisierung der Endometrioseherde beitragen. Aus diesem Grund wurde die Verteilung CD34/VEGFR-2-positiver EPCs in uterinen Gewebeproben vor und nach Fixation an die laterale Bauchwand der Versuchstiere genauer analysiert.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass frisch entnommenes Uterusgewebe keine Zellen enthielt, die doppelt positiv für CD34 und VEGFR-2 waren (*Abbildung 18 A-C*). Im Gegensatz dazu konnten an Tag 7 und 28 CD34/VEGFR-2-positive EPCs in den sich entwickelnden Endometrioseherden nachgewiesen werden (*Abbildung 18 D-I*). Dieser Nachweis von EPCs in den Endometrioseherden an den späten Untersuchungszeitpunkten korrelierte mit der Rekrutierung zirkulierender EPCs aus dem Knochenmark in die Herde.

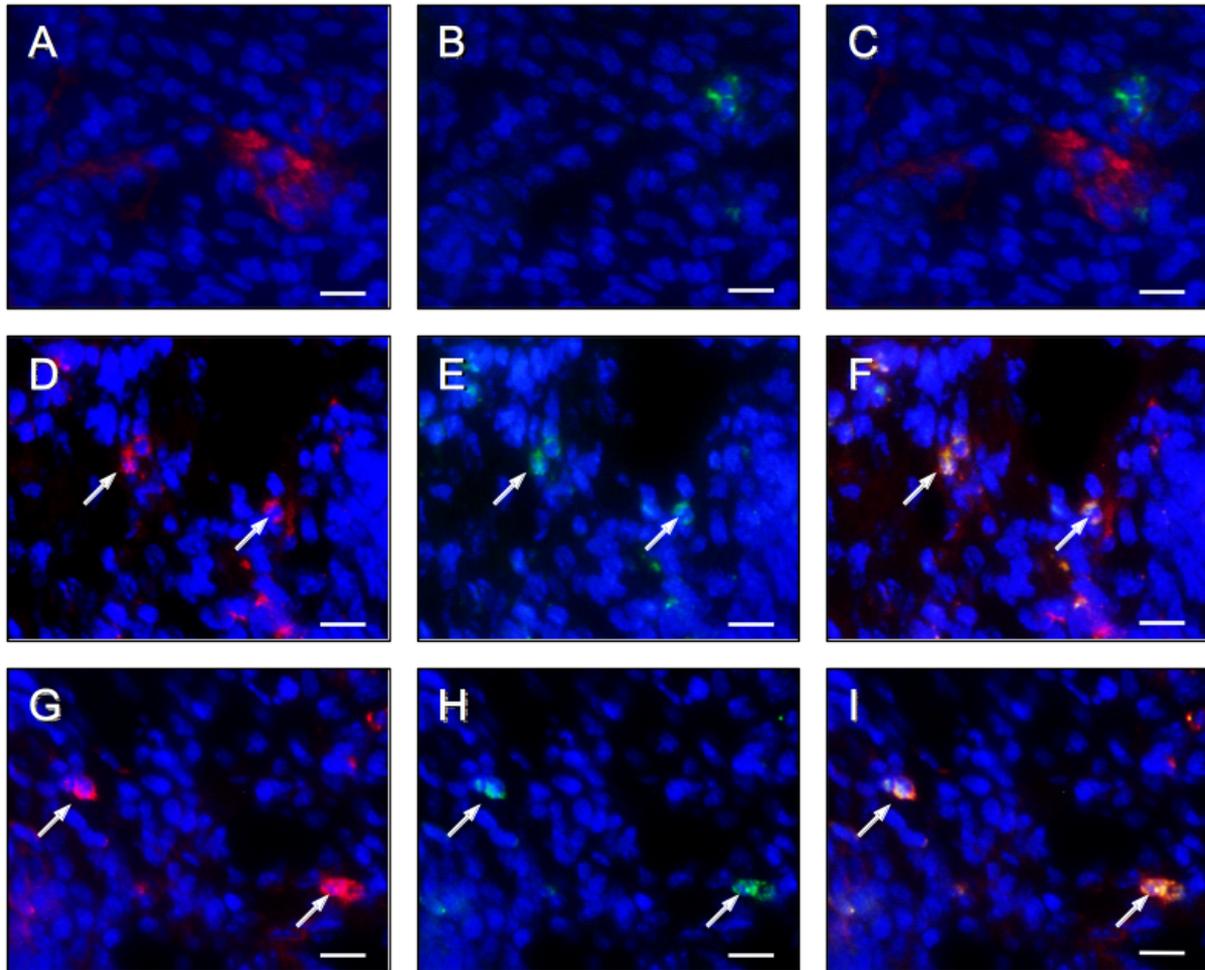


Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CD34- und VEGFR-2-expressierenden Zellen in Uterusfragmenten von FVB/N-Mäusen direkt vor (A bis C), sowie an den Tagen 7 (D bis F) und 28 (G bis I) nach Transplantation an die laterale Bauchwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen. Die histologischen Schnitte wurden mit Hoechst 33342 zur Darstellung der Zellkerne (A bis I, blau), einem Antikörper gegen CD34 (A, C, D, F, G, I, rot) und einem Antikörper gegen VEGFR-2 (B, C, E, F, H, I, grün) gefärbt. C, F und I entsprechen den Überlagerungen von A und B, D und E sowie G und H. Frisch isolierte Uterusfragmente enthalten keine Zellen, die sowohl positiv für CD34 als auch VEGFR-2 sind (A bis C). Im Gegensatz dazu enthalten Endometrioseherde an den Tagen 7 und 28 vermehrt CD34/VEGFR-2-positive EPCs (D bis I, Pfeile) (Skalierung: 20 μ m).

6.4. SDF-1-EXPRESSION IN ENDOMETRIOSEHERDEN

Das Chemokin SDF-1 wurde bereits in anderen Studien als ein wichtiger chemotaktischer Faktor für die Rekrutierung von EPCs in hypoxische Gewebe beschrieben [CERADINI *et al.*, 2004]. Entsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit die SDF-1-Expression in den sich entwickelnden Endometrioseherden untersucht.

3 Tage nach Transplantation uteriner Gewebefragmente in die Peritonealhöhle der Empfängertiere waren 5% der Zellen innerhalb des Gewebes positiv für SDF-1 (Abbildung 19 A und E). Im Gegensatz dazu betrug die SDF-1-Expression an Tag 7

nahezu 75% (Abbildung 19 B und E). Im weiteren Verlauf nahm der Anteil SDF-1-exprimierender Zellen kontinuierlich ab und betrug an Tag 14 noch 21% und an Tag 28 nur noch 4% (Abbildung 19 C-E).

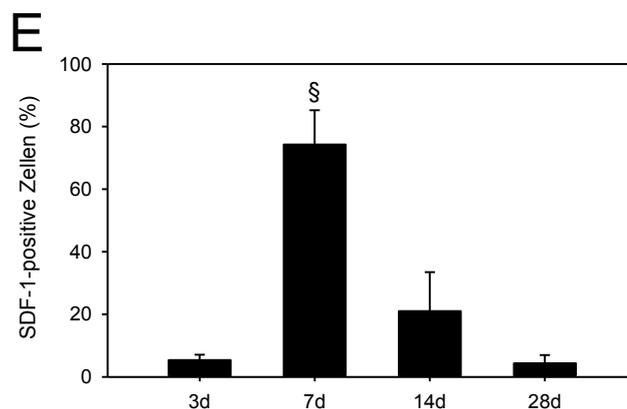
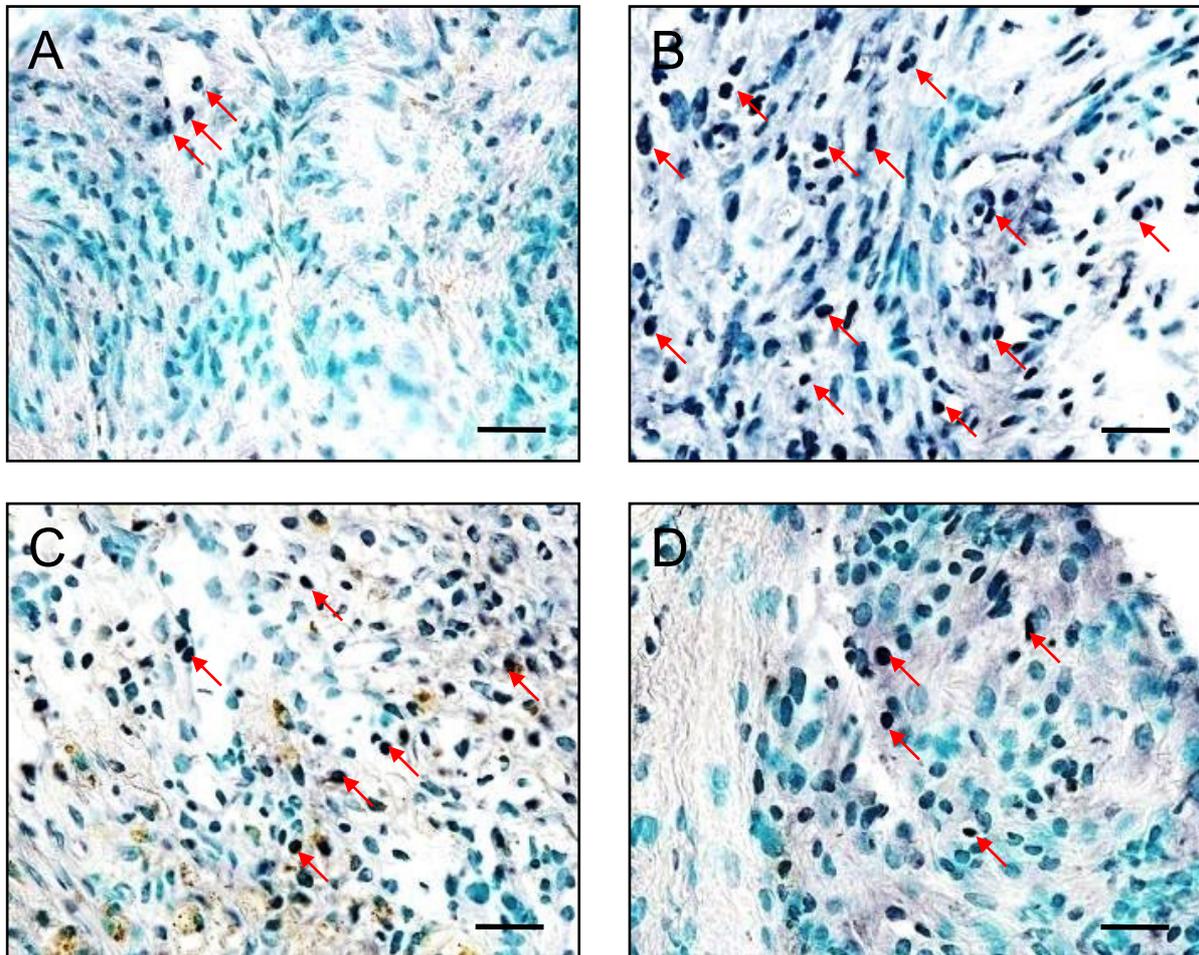


Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung SDF-1-exprimierender Zellen (A bis D, schwarz, exemplarisch hervorgehoben durch rote Pfeile) in Endometrioseherden an Tag 3 (A), 7 (B), 14 (C) und 28 (D) nach Fixation von Uterusgewebe aus FVB/N-Mäusen an die laterale Bauchwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen (Skalierung: 30 µm). E: Anteil (in %) SDF-1-positiver Zellen in Endometrioseherden an Tag 3, 7, 14 und 28. Mittelwerte ± SEM. § $P < 0,05$ versus Tag 3, 14 und 28.

6.5. VASKULARISIERUNG UND EPCs IN AMD3100-BEHANDELTEN TIEREN

In weiteren Experimenten wurde der Beitrag zirkulierender EPCs an der Vaskularisierung von Endometrioseherden genauer untersucht. Hierzu wurden Versuchstiere, die mit dem selektiven SDF-1/CXCR4-Rezeptorantagonisten AMD3100 behandelt wurden, mit Kontrollmäusen verglichen, denen lediglich die wirkstofflose Trägerlösung (PBS) injiziert wurde.

Die Behandlung mit AMD3100 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikant verringerten Anteil GFP-positiver Endothelzellen in den Endometrioseherden an Tag 14 (*Abbildung 20A*). So betrug der Anteil GFP-positiver Endothelzellen in der mit AMD3100 behandelten Gruppe lediglich 5,6% im Vergleich zu 17,6% in der Kontrollgruppe.

Intravitalfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Herde zeigten weiterhin, dass dies mit einer signifikant reduzierten funktionellen Kapillardichte in den Herden an Tag 14 assoziiert war (*Abbildung 20B*). Diese lag in der mit AMD3100 behandelten Gruppe bei 185 cm/cm² im Vergleich zu 267 cm/cm² in der Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rekrutierung von EPCs in die sich entwickelnden Herde maßgeblich zu deren Vaskularisierung beitragen.

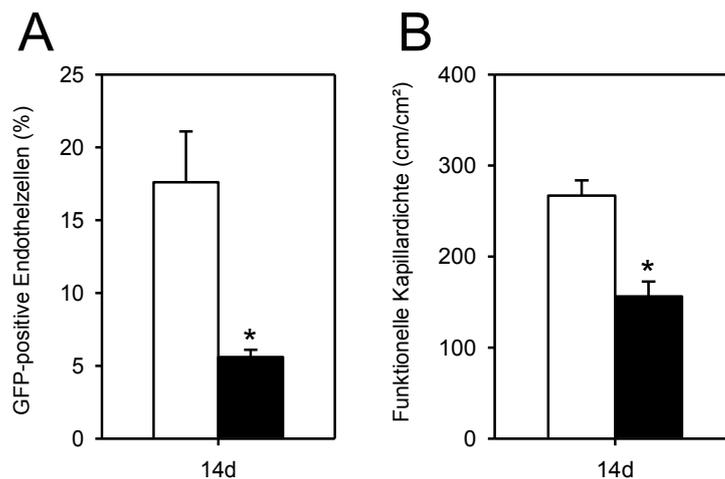


Abbildung 20: Anteil (in %) GFP-positiver Endothelzellen und funktionelle Kapillardichte (in cm/cm²) der sich entwickelnden Endometrioseherde an Tag 14 nach Fixierung von Uterusgewebe von FVB/N-Mäusen an die laterale Bauchwand von Tie2-GFP-knochenmarktransplantierten Mäusen, die täglich mit dem SDF-1/CXCR4-Antagonisten AMD3100 (schwarze Balken) oder mit dem Vehikel PBS (weiße Balken) behandelt wurden. Auswertung mittels Immunhistochemie (A) bzw. intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und computergestütztem Bildverarbeitungssystem (B). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

6.6. EPC-ANZAHL IM PERIPHEREN BLUT, KNOCHENMARK UND MILZ

In zusätzlichen Experimenten wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen analysiert, ob die Transplantation von Uterusfragmenten auch mit einer erhöhten Anzahl von EPCs im Blut, Knochenmark und Milz von C57BL/6-Mäusen assoziiert ist.

Basierend auf den zuvor beschriebenen intravitalfluoreszenzmikroskopischen Ergebnissen wurden ein früher Studienzeitpunkt (Tag 3 nach Transplantation) und ein späterer Zeitpunkt (Tag 14 nach Transplantation) gewählt. Ab Tag 14 wiesen nahezu alle Endometrioseherde eine eigene Blutversorgung auf (siehe 6.2.1.1.).

Die Analysen zeigten, dass die Induktion der Endometrioseherde zu beiden Untersuchungszeitpunkten nicht zu einer erhöhten Anzahl zirkulierender Sca-1/VEGFR-2-positiver EPCs im Blut führte (Abbildung 21A). Im Knochenmark der Endometriose-Mäuse war die Anzahl dieser Zellen an Tag 3 im Vergleich zu Tag 14 signifikant erhöht (Abbildung 21B). Vergleichbare Resultate lieferten jedoch auch die Analysen des Knochenmarks der Sham-operierten Mäuse, so dass die erhöhte EPC-Anzahl im Knochenmark eher als konsekutive Antwort auf das chirurgische Trauma zu werten ist, als auf eine direkte Stimulation durch die induzierten Endometrioseherde.

Die Anzahl der EPCs in der Milz war in den Endometriose-Mäusen, Sham-operierten Mäusen und unbehandelten Kontrollmäusen zu beiden Untersuchungszeitpunkten nicht unterschiedlich (Abbildung 21C).

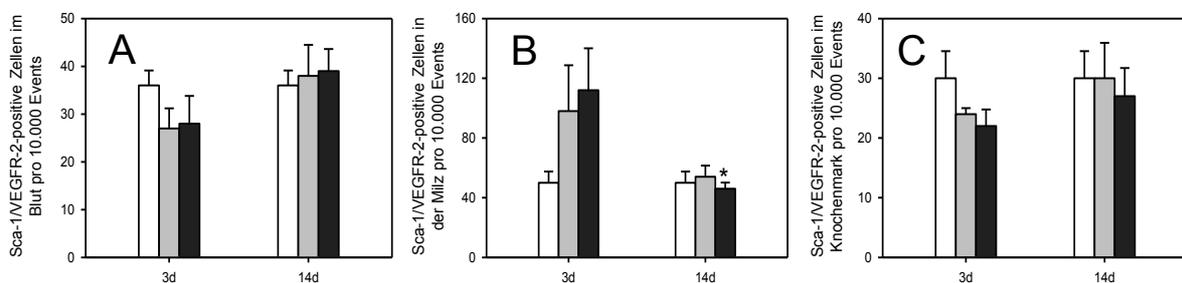


Abbildung 21: Anzahl Sca-1/VEGFR-2-positiver EPCs pro 10.000 Events im Blut (A), im Knochenmark (B) und in der Milz (C) Sham-operierter (graue Balken) und unbehandelter Tiere (weiße Balken) sowie in C57BL/6-Mäusen mit induzierter Endometriose (schwarze Balken) an den Tagen 3 und 14. Analyse mittels Durchflusszytometrie. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ versus Tag 3.

6.7. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie wurde erstmals der Prozess der Vaskulogenese in der Pathogenese der Endometriose untersucht. Mit Hilfe eines transgenen Endometriose-Mausmodells, welches die Detektion GFP-positiver EPCs in peritonealen Endometrioseherden ermöglichte, konnten folgende Ergebnisse erarbeitet werden:

1. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte peritoneale Endometrioseinduktion führte im Verlauf zu einer gesteigerten Anzahl von EPCs in den Endometrioseherden. Zwar blieb der Gesamtanteil der GFP-positiven EPCs an der durchschnittlichen Gesamtzellzahl pro Herd mit 1‰ gering, jedoch lagen 95% dieser Zellen als Gefäßendothelzellen vor. Der Anteil GFP-positiver Endothelzellen an der Gesamtzahl aller Endothelzellen pro Endometrioseherd betrug im Verlauf 0% (Tag 3), 18% (Tag 7), 15% (Tag 14) und 13% (Tag 28).
2. Die verstärkte Rekrutierung von EPCs in die Endometrioseherde zu den späteren Untersuchungszeitpunkten führte zu einer signifikant gesteigerten Vaskularisierung der Herde. Es kam im Verlauf zu einem signifikanten Anstieg der funktionellen Kapillardichte bis auf einen Wert von ca. 300 cm/cm² an Tag 28.
3. Die peritoneale Endometrioseinduktion führte zu einer signifikant gesteigerten Expression von SDF-1. An Tag 7 exprimierten ca. 75% der Zellen innerhalb eines Herdes SDF-1. Mit Zunahme der mikrokapillären Blutversorgung und damit abnehmender Gewebehypoxie sank der Anteil SDF-1-exprimierender Zellen auf 4% an Tag 28 ab.
4. Die Behandlung von Versuchstieren nach Endometrioseinduktion mit dem selektiven SDF-1/CXCR4-Antagonisten AMD3100 führte zu einer signifikant verringerten Anzahl rekrutierter EPCs in den Endometrioseherden. Bedingt durch den geringeren Anteil GFP-positiver EPCs in den Herden kam es zu einer signifikanten Abnahme der funktionellen Kapillardichte auf 185 cm/cm² im Vergleich zu 267 cm/cm² in der Kontrollgruppe zum gleichen Untersuchungszeitpunkt.

5. Die Anzahl zirkulierender EPCs im peripheren Blut wurde durch die peritoneale Endometrioseinduktion nicht signifikant erhöht. Die Zahl der EPCs im Knochenmark war an Tag 3 nach Transplantation von Uterusfragmenten im Vergleich zu Tag 14 in allen 3 Subgruppen erhöht. Bezüglich der EPC-Anzahl in der Milz ergab sich zwischen den jeweiligen Gruppen zu beiden Untersuchungszeitpunkten kein signifikanter Unterschied.

7. DISKUSSION

7.1. DISKUSSION DER METHODEN

Die spontane Entstehung einer Endometriose ist aufgrund der Hormon- und Menstruationsabhängigkeit dieser Erkrankung nur bei Menschen und Primaten möglich [GRÜMMER *et al.*, 2006]. Früher noch häufig benutzte Primatenmodelle sind wegen ihrer Kostenintensität durch Tierhaltung und -pflege und nicht zuletzt wegen ethischer Bedenken umstritten und inzwischen in den Hintergrund getreten. Mittlerweile wurden verschiedene Endometriosemodelle unter Verwendung von Nagetieren etabliert, in denen Endometrioseherde durch Transplantation von Endometriumfragmenten an unterschiedliche Lokalisationen des Körpers induziert werden. Dabei besteht die Möglichkeit, nicht nur Endometrium der gleichen Spezies, sondern beispielsweise auch humanes Endometriumgewebe in immuninkompetente Mäuse zu transplantieren [BRUNER *et al.*, 1997; EGGERMONT *et al.*, 2005; HULL *et al.*, 2005].

Aufgrund der Lokalisation der Endometrioseherde unterscheidet man zwischen extra- und intraperitonealen Endometriosemodellen. Bei den extraperitonealen Endometriosemodellen werden Endometrioseherde außerhalb der Bauchhöhle durch Transplantation von Endometrium induziert, wie zum Beispiel beim Modell der Rückenhautkammer [MENGER *et al.*, 2002; LASCHKE und MENGER, 2007; LASCHKE *et al.*, 2008]. Beim Modell der intraperitonealen Endometriose werden Endometriumfragmente in die Peritonealhöhle der Versuchstiere transplantiert. So kann die Erkrankung in einer der häufigsten Endometrioselokalisierungen des Menschen nachgeahmt werden. Endometriumfragmente können vorsichtig vom Myometrium abgelöst werden und als Suspension intraabdominell injiziert werden [SOMIGLIANA *et al.* 1999; HIRATA *et al.*, 2005]. Dieser Ansatz hat jedoch den Nachteil, dass die zufällig verteilten Endometrioseherde in der Bauchhöhle nur unter erhöhtem Zeitaufwand lokalisiert und danach analysiert werden können. Insbesondere bei nicht-invasiven Untersuchungstechniken wie der Biolumineszenz oder hochauflösenden Ultraschallverfahren verstärkt sich dieser Nachteil [BECKER *et al.*, 2006; LASCHKE *et al.*, 2010]. Um dieses Problem zu umgehen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit Endometrioseherde chirurgisch über eine mediane Laparotomie durch Annähen der Uterusfragmente an

die Bauchwand induziert. Dabei enthielten die ausgestanzten Uterusfragmente nicht nur Endometrium, sondern auch das darunterliegende Myometrium und Perimetrium des Uterus. *KÖRBEL et al.* [2010] konnten nachweisen, dass die räumliche Orientierung der Gewebeschichten der ausgestanzten Uterusfragmente zum Peritoneum und deren Größe signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Endometrioseherde hat. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Uterusfragmente standardisiert mittels einer 2mm-Biopsiestanze präpariert. Auch wurde auf eine standardisierte Orientierung mit Fixierung des Endometriums an das Peritoneum geachtet.

Die Vaskularisierung der Endometrioseherde wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Technik bietet für Analysen dynamischer Prozesse wie beispielsweise der Angiogenese oder Vaskulogenese ideale Voraussetzungen [*VAJKOCZY et al.*, 2000]. Andere Untersuchungsverfahren wie die Mikrosphären-Technik [*KINGMA et al.*, 2005], die Xenon-Clearance-Technik [*OMAN et al.*, 2004] oder die Laser-Doppler-Flowmetrie [*WELLHÖNER et al.*, 2006] liefern nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation und wären daher für die vorliegende Arbeit ungeeignet gewesen. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie können die einzelnen Segmente der Mikrozirkulation wie Arteriolen, Venolen und Kapillaren in hoher Auflösung direkt visualisiert werden [*MENGER et al.*, 1993; *LASCHKE et al.*, 2005]. In Kombination mit der Epi-illuminationstechnik, die schon seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts erfolgreich angewendet wird [*PLOEM et al.*, 1974], ist weiterhin eine direkte Visualisierung auch nicht transilluminierbarer Gewebe möglich [*RAMSHESH et al.*, 2006]. Durch den Einsatz geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe, wie Rhodamin 6G, besteht die Möglichkeit, das Fließverhalten einzelner Blutbestandteile, wie Leukozyten und Thrombozyten, direkt zu untersuchen [*MENGER et al.*, 1992; *HOFFMANN et al.*, 2000]. Daneben können auch Zellschäden wie Apoptose und Nekrose in den zu untersuchenden Geweben visualisiert werden [*HARRIS et al.*, 1997; *WESTERMANN et al.*, 1999]. Durch den Einsatz von FITC-Dextran, welches als großes Molekül unter physiologischen Bedingungen im Intravasalraum verbleibt, können außerdem Veränderungen der Endothelpermeabilität analysiert werden [*PRIES*, 1988; *MENGER et al.*, 1992]. Aufgrund dieser vielfältigen Möglichkeiten wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in den vergangenen Jahren häufig für Untersuchungen der

Mikrozirkulation des Gehirns [*BEN MIME et al., 2005*], des Pankreas [*OBERMAIER et al., 2002*] des Herzens [*SATO et al., 2004*] oder des Knochens [*KLENKE et al., 2005*] eingesetzt.

Beim Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ist die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und eine damit verbundene Phototoxizität für das untersuchte Gewebe zu berücksichtigen [*PENNING und DUBBELMAN, 1994*]. Durch eine lange Einwirkdauer des verwendeten Lichts können diese phototoxischen Effekte besonders stark ausgeprägt sein [*POVLISHOCK et al., 1983*]. Typische phototoxische Effekte sind eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung [*ROSENBLUM, 1978; HERRMANN, 1983*], Endothelschäden [*REED und MILLER, 1988*], Vasospasmen [*SAETZLER et al., 1997*], gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen [*GAWLOWSKI et al., 1989*] oder eine Reduktion der funktionellen Kapillardichte [*FRIESENECKER et al., 1994*]. Um die negativen Auswirkungen phototoxischer Effekte zu minimieren, sollte bei der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie auf eine kurze Untersuchungszeit geachtet und die üblichen Dosierungen der Fluoreszenzfarbstoffe nicht überschritten werden [*STEINBAUER et al., 2000*]. Diese Kriterien wurden in der vorliegenden Arbeit erfüllt. So lag die durchschnittliche Untersuchungszeit pro Herd unter 15 Minuten.

7.2. DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Die Oberflächenmessung der Endometrioseherde an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zeigte eine signifikante Abnahme der Oberfläche im Verlauf. Dies könnte damit erklärt werden, dass die initiale Bestrahlung der FVB/N-Mäuse zu einer funktionellen Ovariectomie mit deutlich erniedrigten Östrogenleveln führte [*EBY et al., 1989*]. Dadurch wird das Herdwachstum gehemmt und es kommt zu einer Herdregression [*HAGLUND et al., 2008*].

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass zirkulierende EPCs aus dem Knochenmark in das mikrovaskuläre Netzwerk induzierter Endometrioseherde integriert werden. Damit wurde erstmalig bewiesen, dass zusätzlich zur Angiogenese, d.h. die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits bestehen-

den Gefäßen, auch der Prozess der Vaskulogenese, d.h. die Neubildung von Gefäßen aus EPCs, ein wesentlicher Mechanismus in der Pathogenese der Endometriose darstellt.

In den letzten Jahrzehnten wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass EPCs an der Vaskularisierung von Tumoren und anderen ischämischen Geweben beteiligt sind [ASAHARA *et al.*, 1997; SHI *et al.*, 1998; KOPP *et al.*, 2006]. Einige Studien berichten sogar, dass sich 50 bis 100% von Tumorgefäßen aus EPCs bilden [LYDEN *et al.*, 2001; GARCIA-BARROS *et al.*, 2003]. In den meisten Studien wurden allerdings nur wenige EPCs in den Gefäßnetzwerken von Tumoren nachgewiesen [DE PALMA *et al.*, 2003; MACHEIN *et al.*, 2003; PURHONEN *et al.*, 2008; AHN *et al.*, 2009]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass etwa 15% aller Endothelzellen innerhalb der sich entwickelnden Endometrioseherde von zirkulierenden EPCs stammen. Dieser Anteil erscheint recht hoch, wenn man bedenkt, dass sich die für die Knochenmarktransplantation notwendige Bestrahlung wahrscheinlich deutlich auf die Produktion pro-angiogener Wachstumsfaktoren und Chemokine für die Rekrutierung von EPCs auswirkt. Allerdings bilden sich Endometrioseherde aus versprengtem Endometrium, was ein großes regeneratives Potential besitzt und zahlreiche mesenchymale Stammzellen enthält [GARGETT *et al.*, 2009; MASUDA *et al.*, 2015]. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch das normale Endometrium im Uterus ein wichtiges Zielgewebe für das Homing zirkulierender Knochenmarkstammzellen ist [DU *et al.*, 2007]. Es ist somit denkbar, dass endometriales Gewebe gute Voraussetzungen für das Einnisten und Ausreifen von Knochenmarkstammzellen bietet, sodass der in dieser Arbeit nachgewiesene Anteil von 15% EPCs als durchaus nachvollziehbar angesehen werden kann. Ausserdem kommen auch andere Studien, welche die Rekrutierung von Knochenmarkstammzellen an der Vaskularisierung von Transplantatgeweben analysierten, zu ähnlichen Ergebnissen. CAPLA *et al.* [2006] berichten beispielsweise, dass 15 bis 20% der Endothelzellen in Blutgefäßen freier Hauttransplantate auf EPCs zurückzuführen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Endometrioseherde in knochenmarktransplantierten Tie2-GFP-Mäusen induziert. Nahezu alle detektierten GFP-positiven Zel-

len innerhalb der Herde wurden hierbei in das mikrovaskuläre Endothel integriert. Nur ein geringer Anteil der Zellen war im umgebenden endometrialen Stromagewebe lokalisiert. Es ist möglich, dass diese Zellen nicht direkt zum Pool der zirkulierenden EPCs gehörten. Diese Interpretation wird durch Studien an FVB/N-TgN (Tie2/GPF) 287 Sato-Mäusen gestützt, in denen im Knochenmark Tie2-GFP-positive Stammzellen nachgewiesen werden konnten. Diese Zellen exprimieren sowohl den hämatopoetischen Marker CD45, als auch die Endothelzellmarker CD34, VEGFR2 und CD31 [SHAW *et al.*, 2004]. Entsprechend könnte es eine gemeinsame hämatopoetische Vorläuferzelle geben, aus der sich sowohl EPCs als auch hämatopoetische Stammzellen entwickeln, welche sich in der Folge zu lymphatischen und myeloischen Zellen differenzieren. Andererseits ist es auch denkbar, dass separate angioblastische und hämatopoetische Vorläuferzellen existieren. Weiterhin ist der Differenzierungsgrad der Tie2-GFP-positiven Zellpopulation der verwendeten Sato-Mäuse heterogen, was ebenfalls als Erklärung dafür dienen könnte, dass nicht alle zirkulierenden GFP-positiven Zellen als EPCs in das neugebildete Endothel der Endometrioseherde integriert wurden.

Die Rekrutierung von EPCs in ein Gewebe ist hauptsächlich von dessen Blutversorgung, aber auch von dort ablaufenden mikrovaskulären Remodellierungsprozessen abhängig [CAPLA *et al.*, 2006]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Endometrioseherde mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie und immunhistochemischer Untersuchungen genauer untersucht. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Vaskularisierung der Uterusfragmente in diesem Modell der peritonealen Endometriose im Zeitverlauf deutlichen Veränderungen unterliegt. Hierzu zählen der Verlust vorbestehender CD31-positiver Gefäße während der avaskulären Phase und die anschließende Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerkes durch Einsprossen von Blutgefäßen aus dem umgebenden Empfängergewebe. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die Rekrutierung von zirkulierenden EPCs in die sich entwickelnden Endometrioseherde parallel zum Aufbau einer eigenen Blutversorgung ab Tag 7 nach Transplantation erfolgt. Vor dem 7. Tag konnten keine CD34/VEGFR-2-positiven EPCs in den Endometrioseherden nachgewiesen

werden. Dies zeigt, dass weder zirkulierende EPCs, noch lokale gewebeansässige EPCs an der Initialisierung der Vaskularisierung der Herde beteiligt waren.

Die höchste Anzahl SDF-1-exprimierender Zellen innerhalb der Endometrioseherde konnte erst am 7. Tag nach Transplantation der Uterusfragmente in die Bauchhöhle nachgewiesen werden. Zusammen mit der Tatsache, dass die Herde am 3. Tag nach Transplantation keine Perfusion aufwies, könnte dies dafür sprechen, dass ein geringes Maß einer erneut einsetzenden Blutzirkulation Voraussetzung für die nötigen Signalmechanismen für den Transport von EPCs in die ektopen endometrialen Gewebefragmente ist. Des Weiteren führte die Behandlung mit dem selektiven SDF-1/CXCR4-Antagonisten AMD3100 zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl rekrutierter zirkulierender EPCs, was mit einer signifikanten Abnahme der funktionellen Kapillardichte in den Herden einher ging. Dies belegt, dass EPCs wesentlich zur Vaskularisierung von Endometrioseherden über den Prozess der Vasculogenese beteiligt sind.

Trotz der abnehmenden Zahl SDF-1-exprimierender Zellen innerhalb der Endometrioseherde und der zeitgleich steigenden funktionellen Kapillardichte über den Beobachtungszeitraum, blieb die Zahl GFP-positiver Zellen zwischen Tag 14 und 28 relativ konstant. Neben der Hypoxie-stimulierten SDF-1-Ausschüttung müssen demzufolge andere Mechanismen an der Rekrutierung der EPCs beteiligt gewesen sein. So ist es beispielsweise möglich, dass durch erhöhten endothelialen Scherstress die Produktion bestimmter adhäsiver Selektin- und Integrin-Moleküle gesteigert war, für die gezeigt werden konnte, dass sie die Adhäsion von EPCs an geschädigtes Endothel begünstigen [HRISTOV *et al.*, 2007; ZAMPETAKI *et al.*, 2008]. Ebenso könnten aktivierte Thrombozyten, die sich am Endothel ischämiegeschädigter Kapillaren anlagern, zu einer Adhäsion der EPCs beigetragen haben [LEV *et al.*, 2006].

Die Anzahl im Blutstrom zirkulierender EPCs ist nach Myokardinfarkt, koronarer Bypass-Operation oder starkem körperlichen Training deutlich erhöht [SHINTANI *et al.*, 2001; LAUFS *et al.*, 2004]. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit auch analysiert, ob die Ausbildung einer Endometriose mit einer erhöhten Anzahl zirkulierender EPCs im Blut assoziiert ist. In diesem Fall könnte die EPC-Anzahl im Blut als neuer diagnostischer Biomarker für die Erkrankung genutzt werden. Aller-

dings wurden zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren keine Unterschiede in der Zahl der zirkulierenden EPCs gefunden. Darüberhinaus war auch die Anzahl der EPCs im Knochenmark und in der Milz der Endometriose-Tiere im Vergleich zu den sham-operierten und unbehandelten Kontrolltieren nicht erhöht. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der physiologische Pool an zirkulierenden EPCs für die Akkumulation und Rekrutierung der Zellen in das mikrovaskuläre Netzwerk der sich entwickelnden Endometrioseherde ausreicht. Allerdings wurde die Anzahl der EPCs nur an zwei Untersuchungszeitpunkten in der frühen Phase der Entstehung der Endometrioseherde untersucht. Es ist daher nicht auszuschließen, dass unter klinischen Bedingungen die Anzahl von EPCs bei Patientinnen mit chronisch bestehender Endometriose oder einer schweren klinischen Verlaufsform erhöht ist.

7.3. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND KLINISCHE PERSPEKTIVEN

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die postnatale Vaskulogenese eine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie Tumorwachstum und Arteriosklerose hat. Die hier vorliegende Arbeit zeigt nun erstmals, dass die postnatale Vaskulogenese auch bei der Endometriose eine wichtige Rolle spielt. So konnten nicht nur EPCs in Endometrioseherden nachgewiesen werden, sondern es wurde auch gezeigt, dass diese EPCs unmittelbar zur Vaskularisierung der Endometrioseherde beitragen.

Diese neuen Erkenntnisse bieten die Möglichkeit, EPC-basierte Strategien zur Diagnostik und Behandlung der Endometriose zu entwickeln.

EPCs könnten demnach als neue Biomarker benutzt werden, um das Erkrankungsrisiko eines Patienten für Endometriose oder den Progress einer bestehenden Endometrioseerkrankung abzuschätzen [FASSBENDER *et al.*, 2015]. WERNER *et al.* [2005] berichteten beispielsweise, dass die Anzahl an zirkulierenden CD34/VEGFR-2-positiven EPCs dazu verwendet werden kann, das kardiovaskuläre Outcome bei Patienten zu bestimmen, die an einer koronaren Herzkrankheit leiden. Weiterhin korreliert eine erhöhte Anzahl an EPCs positiv mit der Aktivität einer malignen Tumorer-

krankung [ZHANG *et al.*, 2005]. Interessanterweise hat auch die Anzahl der EPCs im Blut während unterschiedlichen Chemotherapien und anti-angiogenen Therapieregimen einen direkten Einfluss auf die Wirksamkeit der eingesetzten Therapie [GEORGI-*OU et al.*, 2008]. Entsprechend könnten EPCs nicht nur dazu dienen, angiogene Erkrankungen, wie Endometriose, zu entdecken, sondern auch vielmehr die beste anti-angiogene Behandlungsstrategie zu identifizieren oder die optimale biologische Dosis der verwendeten anti-angiogenen Substanzen zu ermitteln.

Weiterhin haben sich EPCs auch als geeignete Vehikel für die systemische Applikation in der Tumor-Gentherapie erwiesen [DUDEK, 2010]. Hierfür werden EPCs isoliert und mit einem Gen bestückt, das für ein therapeutisches Protein kodiert. Diese modifizierten EPCs werden erneut dem Tumorpatienten injiziert, wo sie gezielt durch Vaskulogenese in die tumorösen Gefäßnetzwerke integriert werden. Im Gegensatz zur lokalen, intratumorösen Gentherapie gelingt es mit diesem zellbasierten Verfahren, Tumore oder Metastasen zu erreichen, die einem direkten diagnostischen oder therapeutischen Verfahren nur schwer zugänglich sind. Denkbar wäre es, diese EPC-gestützte Gentherapie in ähnlicher Weise auf die Behandlung der Endometriose zu übertragen.

Zusammenfassend zeigen diese Beispiele, dass neue Erkenntnisse über die Mechanismen der postnatalen Vaskulogenese zur Entwicklung vielversprechender diagnostischer und therapeutischer Strategien führen. Zukünftige Studien sollten daher klären, ob diese Strategien auch für die Diagnose und Behandlung der Endometriose anwendbar sind. Hierbei wird es zunächst nötig sein, die Mechanismen genau zu analysieren, welche die Mobilisierung und Rekrutierung von EPCs in Endometrioseherden regulieren.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Ahn GO, Brown JM:** Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis* 2009, 12:159-64.
2. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM:** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275:964-67.
3. **Augustin HG, Braun K, Telemenakis I, Modlich U, Kuhn W:** Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression. *Am J Pathol* 1995, 147:339-51.
4. **Baker M, Wayland H:** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 1974, 7:131-43.
5. **Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ:** A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol* 2006, 168:2074-84.
6. **Ben Mime L, Arnhold S, Fischer JH, Addicks K, Rainer de Vivie E, Bennink G, Suedkamp M:** Pharmacologic cerebral capillary blood flow improvement after deep hypothermic circulatory arrest: an intravital fluorescence microscopy study in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005, 130:670-76.
7. **Benagiano G, Brosens I:** The history of endometriosis: identifying the disease. *Hum Reprod* 1991, 6:963-8.

8. **Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG:** Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99:2851-7.
9. **Caligioni CS:** Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009, Appendix 4I.
10. **Capla JM, Ceradini DJ, Tepper OM, Callaghan MJ, Bhatt KA, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC:** Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2006, 117:836-44.
11. **Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC:** Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004, 10:858-64.
12. **Ceradini DJ, Gurtner GC:** Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc Med* 2005, 15:57-63.
13. **Cullen TS:** Adenomyoma of the uterus. Philadelphia: W.B. Saunders, 1908.
14. **D'Amore PA, Thompson RW:** Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1987, 49:453-64.
15. **De Clercq E:** The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2:581-7.
16. **De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L:** Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003, 9:789-95.

17. **Donzella GA, Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP:** AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med* 1998, 4:72-7.
18. **Du H, Taylor HS:** Contribution of bone marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells* 2007, 25:2082-6.
19. **Dudek AZ:** Endothelial lineage cell as a vehicle for systemic delivery of cancer gene therapy. *Transl Res* 2010, 156:136-46.
20. **Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, Calhaz-Jorge C, D'Hooghe T, De Bie B, Heikinheimo O, Horne AW, Kiesel L, Nap A, Prentice A, Saridogan E, Soriano D, Nelen W; European Society of Human Reproduction and Embryology:** ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2014, 29:400-12.
21. **Eby NL, Boice JD Jr, Gold EB, Hoover RN, Loriaux DL:** Estrogen and androgen levels in women treated with radiation for cervical cancer - possible influence on breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 1989, 129:527-32.
22. **Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Scholtes H, Van Langendonck A:** Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertil Steril* 2005, 84:492-9.
23. **Fainaru O, Adini A, Benny O, Adini I, Short S, Bazinet L, Nakai K, Pravda E, Hornstein MD, D'Amato RJ, Folkman J:** Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J* 2008, 22:522-9.

24. **Fassbender A, Burney RO, O DF, D'Hooghe T, Giudice L:** Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res Int 2015* (2015), p. 130854.
25. **Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH:** Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med 1998*, 4:336-40.
26. **Filippi I, Carrarelli P, Luisi S, Batteux F, Chapron C, Naldini A, Petraglia F:** Different expression of hypoxic and angiogenic factors in human endometriotic lesions. *Reprod Sci 2016*, 23:492-7.
27. **Folkman J:** Angiogenesis in psoriasis: therapeutic implications. *J Invest Dermatol 1972*, 59:40-3.
28. **Folkman J:** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med 1995*, 1:27-31.
29. **Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S:** Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem 1995*, 270:12607-13.
30. **Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M:** Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol 1994*, 267:2204-12.
31. **Galle PC:** Clinical presentation and diagnosis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am 1989*, 16:29-42.

32. **Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R:** Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003, 300:1155-9.
33. **Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D:** Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009, 80:1136-45.
34. **Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ:** Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epillumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 1989, 37:1-15.
35. **Georgiou HD, Namdarian B, Corcoran NM, Costello AJ, Hovens CM:** Circulating endothelial cells as biomarkers of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2008, 5:445-54.
36. **Giudice LC:** Clinical practice. Endometriosis. *N Engl J Med* 2010, 362:2389-98.
37. **Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW:** Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002, 8:607-61.
38. **Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R:** Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005, 8:147-56.
39. **Grümmer R:** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006, 12:641-49.

40. **Haglund KE, Viswanathan AN:** Computed tomography-based radiation therapy of ovarian remnants for symptomatic persistent endometriosis. *Obstet Gynecol* 2008, 111:579-83.
41. **Halban J:** Hysteroadenosis metaplastica. *Wien Klin Wochenschr* 1924, 37:1205-6.
42. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K:** Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1997, 273:989-96.
43. **Herrmann KS:** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photo-chemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 1983, 26:238-49.
44. **Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Morimoto C, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y:** Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum Reprod* 2005, 20:2092-96.
45. **Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD:** The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Shock* 2000, 14:528-34.
46. **Hristov M, Erl W, Weber PC:** Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:1185-9.
47. **Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, Weber C:** Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost* 2007, 98:274-7.

48. **Hristov M, Weber C:** Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 2008, 19:491-7.
49. **Hristov M, Weber C:** Progenitor cell trafficking in the vascular wall. *J Thromb Haemost* 2009, 7:31-4.
50. **Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS:** Nime-sulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 2005, 20:350-8.
51. **Ichida M, Gomi A, Hiranouchi N, Fujimoto K, Suzuki K, Yoshida M, Nokubi M, Masuzawa T:** A case of cerebral endometriosis causing cata-menial epilepsy. *Neurology* 1993, 43:2708-9.
52. **Kingma JG Jr, Simard D, Rouleau JR:** Comparison of neutron activated and radiolabeled microsphere methods for measurement of transmural myocardial blood flow in dogs. *J Thromb Thrombolysis* 2005, 19:201-8.
53. **Klenke FM, Merkle T, Fellenberg J, Abdollahi A, Huber PE, Gebhard MM, Ewerbeck V, Sckell A:** A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy. *Lab Anim* 2005, 39:377-83.
54. **Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H:** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 1997, 42:168-75.
55. **Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S:** Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001, 7:430-6.

56. **Kopp HG, Ramos CA, Rafii S:** Contribution of endothelial progenitors and pro-angiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol* 2006, 13:175-81.
57. **Körbel C, Menger MD, Laschke MW:** Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. *Hum Reprod* 2010, 25:2551-8.
58. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Menger MD:** In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 2005, 84:1199-1209.
59. **Laschke MW, Menger MD:** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007, 13:331-42.
60. **Laschke MW, Schwender C, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD:** Epigallocatechin-3-gallate inhibits estrogen-induced activation of endometrial cells in vitro and causes regression of endometriotic lesions in vivo. *Hum Reprod* 2008, 23:2308-18.
61. **Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD:** High-resolution ultrasound imaging: a novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol* 2010, 176:585-93.
62. **Laschke M, van Oijen AV, Scheuer C, Menger M:** In vitro and in vivo evaluation of the anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol. *Br J Pharmacol* 2011, 163:835-44.

63. **Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G:** Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004, 109:220-6.
64. **Leone Roberti Maggiore U, Ferrero S, Mangili G, Bergamini A, Inversetti A, Giorgione V, Viganò P, Candiani M:** A systematic review on endometriosis during pregnancy: diagnosis, misdiagnosis, complications and outcomes. *Hum Reprod Update* 2016, 22:70-103.
65. **Lev EI, Estrov Z, Aboulfatova K, Harris D, Granada JF, Alviar C, Kleiman NS, Dong JF:** Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost* 2006, 96:498-504.
66. **Leyendecker G, Kunz G, Wildt L, Beil D, Deininger H:** Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod* 1996, 11:1542-51.
67. **Leyendecker G, Wildt L, Mall G:** The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 2009, 280:529-38.
68. **Liekens S, De Clercq E, Neyts J:** Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001, 61:253-7.
69. **Lipowsky HH, Zweifach BW:** Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 1978, 15:93-101.
70. **Loughna S, Sato TN:** Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development. *Matrix Biol* 2001, 20:319-25.

71. **Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S:** Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001, 7:1194-201.
72. **Machein MR, Renninger S, de Lima-Hahn E, Plate KH:** Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain Pathol* 2003, 13:582-97.
73. **Mandy FF, Bergeron M, Minkus T:** Principles of flow cytometry. *Transfus Sci* 1995, 16:303-314.
74. **Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP:** Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002, 62:609-14.
75. **Masuda H, Maruyama T, Gargett CE, Miyazaki K, Matsuzaki Y, Okano H, Tanaka M:** Endometrial side population cells: potential adult stem/progenitor cells in endometrium. *Biol Reprod* 2015, 93:84.
76. **Matsumoto T, Kuroda R, Mifune Y, Kawamoto A, Shoji T, Miwa M, Asahara T, Kurosaka M:** Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone* 2008, 43:434-9.
77. **Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K:** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992, 263:1901-6.
78. **Menger MD, Lehr HA:** Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993, 14:519-22.

79. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B:** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002, 34:83-91.

80. **Meyer R:** The status of adenomyosis and adenomyoma, with a discussion of seroepithelial adenomyosis and sarcomatose adenomyometritis. *Zel Gynaecol* 1919, 43:745-50.

81. **Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM, Stainier DY, Sato TN:** Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 2000, 28:75-81.

82. **Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, Bouma-Ter Steege JC, Thijssen VL, Evers JL, Groothuis PG:** Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89:1089-95.

83. **National Research Council:** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *DHHS Publication No. (NIH) 85-23 (Rev.)*, Department of Health and Human Services, Washington, DC (1985).

84. **Obermaier R, Benz S, Von Dobschuetz E, Drognitz O, Schareck W, Jonas L, Messmer K, Hopt UT:** Characterization of microcirculatory disturbance in a novel model of pancreatic ischemia-reperfusion using intravital fluorescence-microscopy. *Pancreas* 2002, 25:142-8.

85. **Oman M, Tolli J, Blind PJ, Naredi P, Hafstrom LO:** ¹³³Xe clearance estimates the effect of vasopressin on peritoneal blood flow in rats. *Hepatogastroenterology* 2004, 51:1037-41.

86. **Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C:** Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:5672-7.
87. **Penning LC, Dubbelman TM:** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 1994, 5:139-46.
88. **Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C:** Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005, 11:261-2.
89. **Ploem JS, De Sterke JA, Bonnet J, Wasmund H:** A microspectrofluorometer with epiillumination operated under computer control. *J Histochem Cytochem* 1974, 22:668-77.
90. **Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP:** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 1983, 110:148-60.
91. **Pries AR:** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988, 7:327-45.
92. **Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpää N, Rajantie I, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P:** Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:6620-5.
93. **Ramshesh VK, Knisley SB:** Use of light absorbers to alter optical interrogation with epiillumination and transillumination in three-dimensional cardiac models. *J Biomed Opt* 2006, 11:024019.

94. **Reed MW, Miller FN:** Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 1988, 36:104-10.
95. **Risau W, Flamme I:** Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11:73-91.
96. **Rosenblum WI:** Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res* 1978, 15:103-6.
97. **Rudzitis-Auth J, Menger MD, Laschke MW:** Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in experimental endometriosis. *Hum Reprod* 2013, 28:1339-47.
98. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF:** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997, 45:505-13.
99. **Sampson JA:** Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927, 14:422-69.
100. **Sanfilippo JS, Wakim NG, Schikler KN, Yussman MA:** Endometriosis in association with uterine anomaly. *Am J Obstet Gynecol* 1986, 154:39-43.
101. **Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R:** Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002, 8:403-9.

102. **Sato K, Komaru T, Shioiri H, Takeda S, Takahashi K, Kanatsuka, Nakayama M, Shirato K:** Hypercholesterolemia impairs transduction of vasodilator signals derived from ischemic myocardium: myocardium-microvessel crosstalk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:2034-9.
103. **Semenza GL:** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:721-32.
104. **Shaw JP, Basch R, Shamamian P:** Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol Dis* 2004, 32:168-75.
105. **Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP:** Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998, 92:362-7.
106. **Shimizu I, Nakanishi R, Yoshino I, Yasumoto K:** An endometrial nodule in the lung without pelvic endometriosis. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1998, 39:867-8.
107. **Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T:** Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001, 103:2776-9.
108. **Shroen DC:** Disputatio Inauguralis Medica de Ulceribus Uteri. Thesis, *University of Jena*, 1690.
109. **Soliman AM, Yang H, Du EX, Kelley C, Winkel C:** The direct and indirect costs associated with endometriosis: a systematic literature review. *Hum Reprod* 2016, 31:712-22.

110. **Somigliana E, Viganò P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P:** Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod* 1999, 14:2944-50.
111. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K:** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000, 385:290-8.
112. **Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ 3rd:** Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril* 1982, 38:667-72.
113. **Taylor RN, Ryan IP, Moore ES, Hornung D, Shifren JL, Tseng JF:** Angiogenesis and macrophage activation in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997, 828:194-207.
114. **Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD:** Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2000, 2:53-61.
115. **Vernon MW, Wilson EA:** Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985, 44:684-94.
116. **Virani S, Edwards AK, Thomas R, Childs T, Tayade C:** Blocking of stromal cell-derived factor-1 reduces neoangiogenesis in human endometriosis lesions in a mouse model. *Am J Reprod Immunol* 2013, 70:386-97.
117. **Wang X, Mamillapalli R, Mutlu L, Du H, Taylor HS:** Chemoattraction of bone marrow-derived stem cells towards human endometrial stromal cells is mediated by estradiol regulated CXCL12 and CXCR4 expression. *Stem Cell Res* 2015, 15:14-22.

118. **Weiss MJ, Orkin SH:** In vitro differentiation of murine embryonic stem cells. New approaches to old problems. *J Clin Invest* 1996, 97:591-5.
119. **Wellhöner P, Rolle D, Lönnroth P, Strindberg L, Elam M, Dodt C:** Laser-Doppler flowmetry reveals rapid perfusion changes in adipose tissue of lean and obese females. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 291:1025-30.
120. **Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G:** Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005, 353:999-1007.
121. **Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD:** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999, 126:881-9.
122. **Xiang Y, Sun S, Cai J, Xiang M, Tang G, Cao X:** Enhancement of fractionated bone marrow transplantation on hematopoietic cell homing in a mouse allogeneic model. *Transplantation* 2004, 77:972-8.
123. **Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q:** Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 2008, 78:413-21.
124. **Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, Dai K, Benson JR, Hussain MM, Klueppelberg U, Norin AJ, Akman HO, Ozcelik T, Batuman OA:** Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood* 2005, 105:3286-94.

9. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger möchte ich an dieser Stelle danken für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas der vorliegenden Arbeit und für die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg tätig zu sein.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. W. Laschke für seine von Beginn an stetige persönliche Unterstützung und Betreuung, zunächst bei der Auswahl des Themas, beim Erlernen der mikrochirurgischen Operationstechniken und schließlich bei der Auswertung der Versuchsreihen. Durch seine unkomplizierte Hilfestellungen und konstruktive Kritik hat er maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg für die freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. rer. med. C. Scheuer für ihre Unterstützung bei den verschiedenen Versuchsvorbereitungen und Laboranalysen, Frau R. Nickels für ihre Hilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen, sowie Frau S. Schuler und bei Frau J. Becker für ihre tatkräftige Mitwirkung im Rahmen der histologischen Auswertungen.

10. PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Laschke MW, **Giebels C**, Nickels RM, Scheuer C, Menger MD. Endothelial progenitor cells contribute to the vascularization of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 2011, 178:442-50.

Übersichtsarbeiten

Laschke MW, **Giebels C**, Menger MD. Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update* 2011, 17:628-36.