

Hochauflösende Ultraschall-Analyse der Proliferation und Zystenbildung von Endometrioseherden im Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Christina Körbel

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
der Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Apl. Prof. Dr. Gerhard Schuler

und

dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes
Betreuer: Prof. Dr. Michael D. Menger

Hochauflösende Ultraschall-Analyse der Proliferation und Zystenbildung von Endometrioseherden im Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Christina Körbel
Tierärztin aus Homburg / Saar
Gießen 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. G. Schuler
Prof. Dr. M.D. Menger

Tag der Disputation: 16. August 2012

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht.....	2
2.1.	Humane Endometriose	2
2.1.1.	Definition und Epidemiologie	2
2.1.2.	Pathogenese der humanen Endometriose	2
2.1.3.	Morphologie humaner Endometrioseherde	3
2.1.4.	Diagnostik und Therapie der humanen Endometriose.....	4
2.2.	Tierexperimentelle Modelle in der Endometriose-	
	forschung.....	7
2.2.1.	Primatenmodelle.....	7
2.2.2.	Modell der Chorioallantois-Membran des Hühnereis.....	7
2.2.3.	Nagermodelle	8
2.3.	Sonographie	11
2.3.1.	Physikalisch-technische Grundlagen der Ultraschallbildgebung.....	11
2.3.2.	Dreidimensionale Ultraschallbildgebung.....	14
2.4.	Ziel der Studie.....	15
3.	Material und Methoden	17
3.1.	Versuchstiere.....	17
3.2.	Vaginale Zyklusbestimmung	17
3.3.	Induktion von Endometrioseherden	18
3.3.1.	Isolierung von Uterusstanzen	18
3.3.2.	Induktion intraperitonealer Endometrioseherde	19
3.3.3.	Induktion subperitonealer Endometrioseherde	21

3.4.	Hemmung des Wachstums subperitonealer Endometrioseherde.....	23
3.4.1.	Chirurgische Behandlung durch Ovariectomie	23
3.4.2.	Behandlung mit Danazol	23
3.5.	Hochauflösende Ultraschall-Analyse von Endometrioseherden.....	24
3.6.	Konventionelle Verfahren zur Volumenbestimmung von Endometrioseherden.....	26
3.7.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	29
3.8.	Konventionelle Histologie und Immunhistochemie.....	30
3.9.	Experimentelles Protokoll.....	31
3.9.1.	Evaluierung des hochauflösenden Ultraschallsystems Vevo770 zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell.....	31
3.9.2.	Analyse verschiedener Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Endometrioseherden im intraperitonealen Modell	32
3.9.3.	Etablierung eines subperitonealen Endometriosemodells	33
3.10.	Statistik	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Evaluierung des hochauflösenden Ultraschallsystems Vevo770 zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell.....	36
4.1.1.	Ultraschalluntersuchung von Endometrioseherden	36
4.1.2.	Einfluss des Schnittabstandes auf die ultraschallbasierte Volumenmessung.....	39
4.1.3.	Intra- und Interobserver-Variabilität	41
4.1.4.	Korrelation der Volumenmessungen mittels Ultraschall, Messschieber und Histologie.....	43

4.2.	Analyse verschiedener Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Endometrioseherden im intraperitonealen Modell	45
4.2.1.	Einfluss der Lokalisation von Uterusstanzen in der Bauchhöhle	45
4.2.2.	Syngene versus autologe Transplantation von Uterusstanzen.....	45
4.2.3.	Einfluss der räumlichen Orientierung von Uterusstanzen.....	47
4.2.4.	Einfluss der Größe transplanteder Uterusstanzen.....	51
4.3.	Etablierung eines subperitonealen Endometriosemodells.....	53
4.3.1.	Vergleich des intraperitonealen Endometriosemodells mit dem subperitonealen Endometriosemodell	53
4.3.2.	Inhibition der endogenen Hormonausschüttung im subperitonealen Endometriosemodell.....	57
4.3.3.	Danazol-Therapie im subperitonealen Endometriosemodell	59
4.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
5.	Diskussion	64
5.1.	Evaluierung des hochauflösenden Ultraschallsystems Vevo770 zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell.....	64
5.2.	Analyse verschiedener Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Endometrioseherden im intraperitonealen Modell	68
5.3.	Etablierung eines subperitonealen Endometriosemodells.....	71
5.4.	Schlussfolgerungen	74
6.	Zusammenfassung.....	75

7.	Summary	77
8.	Literaturverzeichnis	79
9.	Anhang	94
9.1.	Publikationen	94
9.2.	Kongressbeiträge	95
10.	Danksagung	97
11.	Erklärung	98

1. Einleitung

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen des Menschen, unter der etwa 8-10% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter leiden. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung der Endometriose werden meist Nagetier-Modelle eingesetzt. Dabei werden vor allem Mäuse aufgrund ihrer einfachen Zucht und Haltung sowie ihrer guten genetischen Charakterisierung verwendet. Da Mäuse jedoch nicht spontan menstruieren, können Endometrioseherde in diesen Tieren nur durch Transplantation von murinem bzw. humanem Endometrium oder Endometriosegewebe in die Bauchhöhle induziert werden. Bisher wurde das Wachstumsverhalten der sich daraus entwickelnden Endometrioseherde mit Hilfe von einfachen Messschiebern untersucht. Diese invasive Methode ist jedoch sehr ungenau und wird zudem in der Regel nicht repetitiv, sondern zu einem Messzeitpunkt an einzelnen Versuchstieren durchgeführt.

Aus diesem Grund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die hochauflösende Ultraschallbildgebung mit dem Sonographiegerät Vevo770 von VisualSonics erstmalig als qualitative und quantitative Untersuchungsmethode für die Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell zu validieren. Mit Hilfe dieser Technik wurde das Wachstumsverhalten von sich entwickelnden Endometrioseherden in Abhängigkeit der initialen Größe und der räumlichen Orientierung des transplantierten Endometriums sowie des Transplantationsmodus untersucht. Weiterhin wurde ein neues subperitoneales Endometriosemodell etabliert, bei dem sich die Endometrioseherde im Vergleich zum konventionellen intraperitonealen Modell durch ein wesentlich homogeneres, hormonabhängiges Wachstumsverhalten auszeichnen.

2. Literaturübersicht

2.1. Humane Endometriose

2.1.1. Definition und Epidemiologie

Die Endometriose ist definiert durch die Proliferation von endometrialem Drüsengewebe und Stroma außerhalb der Uterushöhle. Sie ist eine der häufigsten nicht-kancerogenen gynäkologischen Krankheiten des Menschen, die bei etwa 8-10% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter auftritt. Die betroffenen Patientinnen leiden häufig an Sterilität, Dysmenorrhö, Dyspareunie, Dysurie und zyklischen Unterbauchschmerzen, was zu einer deutlichen Reduktion der Lebensqualität führt (*Wheeler, 1989; Cramer und Missmer, 2002*). Je nach Lokalisation der Endometrioseherde werden sie in Endometriosis genitalis interna, externa oder extragenitalis eingeteilt. Unter einer Endometriosis genitalis interna, auch Adenomyosis uteri genannt, versteht man das Vorkommen der Herde innerhalb des Myometriums des Uterus. Im Gegensatz dazu findet man bei der Endometriosis genitalis externa Endometrioseherde außerhalb des Uterus in den Organen des kleinen Beckens (v.a. Ovarien, Ligamentum sacrouterina und Douglas-Raum) oder bei der Endometriosis extragenitalis außerhalb des kleinen Beckens (z.B. Darm, Blase und Vagina) (*Stauber und Weyerstahl, 2007*).

2.1.2. Pathogenese der humanen Endometriose

Die Pathogenese der Endometriose ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es gibt verschiedene Theorien zur Entstehung der Erkrankung. Die am weitesten verbreitete Theorie zur Entwicklung von Endometrioseherden ist die Implantationstheorie. Diese Theorie stammt von *Sampson (1927)* und besagt, dass während der Menstruation vitales Endometriumgewebe retrograd durch die Tuben in den Bauchraum gelangt. Günstige Bedingungen führen dort zum Anwachsen des Gewebes auf dem Peritoneum und damit zur Ausbildung von Endometrioseherden. Für diese Theorie spricht das gehäufte Auftreten der Erkrankung bei Frauen, bei denen die Entwicklung der Müllerschen Gänge gestört ist (*Nunley und Kitchin, 1980*), so dass es zu einer Abflussbehinderung des Menstrualblutes oder zum Auftreten von Hyper- und Polymenorrhöen kommt. Weiterhin findet man Endometrioseherde häufig im Douglas-Raum, in dem das Gewebe nach retrograder Menstruation durch die

aufrechte Haltung des Menschen bevorzugt zu finden ist (*Stauber und Weyerstahl, 2007*).

Die Metaplasietheorie besagt, dass wiederholte Irritationen des Zölomepithels Metaplasien induzieren (*Nap et al., 2004*). Diese führen zur Differenzierung der pluripotenten Zölomzellen in endometriales Gewebe. Durch die Kombination der beiden Theorien versucht man, die klinische Vielfalt der Endometriose in ein Konzept zu fassen.

Die immunologische Theorie postuliert, dass eine verminderte immunologische Abwehr zur Entstehung der Endometriose führt. Endometriumfragmente, die in die Bauchhöhle gelangen, werden normalerweise von der körpereigenen Abwehr erkannt und durch Peritonealmakrophagen angegriffen. Bei Frauen mit einem Immundefekt gegen autologes Endometrium wäre eine Implantation und das anschließende Wachstum der Fragmente allerdings durchaus möglich. Durch Unterschiede im zeitlichen Auftreten und dem Ausmaß des Immundefekts werden dabei die unterschiedlichen Manifestationsalter, Schweregrade und klinischen Ausprägungen der Krankheit erklärt (*Stauber und Weyerstahl, 2007*). Das vermehrte familiäre Auftreten der Endometriose bei Verwandten ersten Grades unterstützt die Theorie, dass die Entstehung der Krankheit durch einen Immundefekt infolge einer genetischen Prädisposition begünstigt wird (*Simpson et al., 1980; Zondervan et al., 2001; Bischoff und Simpson, 2004*).

2.1.3. Morphologie humaner Endometrioseherde

Endometrioseherde treten meist als gruppierte, dunkelbraune, stecknadelkopfgroße, leicht erhabene Areale auf dem Peritoneum auf. Darüber hinaus kommen auch gelb oder hellbraun gefärbte Herde vor. Sie können gelegentlich das Zentrum eines Narbensterns bilden. Endometrioseherde wachsen entweder polypös oder infiltrieren subperitoneal das umgebende Bindegewebe. Gelegentlich findet man auch zystische Endometrioseherde auf den Ovarien, sogenannte Schokoladenzysten („Endometriome“), deren cremig, dunkelbrauner Inhalt durch Einblutungen bedingt ist.

Histomorphologisch besteht ein Teil der Endometrioseherde aus hochdifferenziertem Drüsen- und Stromagewebe (*Albee et al., 2008*), das meist denselben zyklischen Veränderungen unterliegt wie das eutope Endometrium des Uterus. Des Weiteren gibt es Herde, deren Drüsenepithel unterschiedliche Differenzierungsgrade aufweist und die keine Hormonabhängigkeit zeigen. Andere

Herde enthalten ein hochdifferenziertes Drüsenepithel ohne endometriumspezifische Differenzierung. Die Drüsenzellen ähneln dabei dem Epithel der Tuben oder der Zervix. Diese Herde weisen ebenfalls keine hormonabhängigen Veränderungen auf.

Nach heutigem Kenntnisstand enthalten ca. 70% aller Endometrioseherde Östrogenrezeptoren, wobei die Rezeptorkonzentration nicht annähernd so hoch ist wie im eutopen Endometrium des Uterus (*Neumannova et al., 1983; Kauppila et al., 1984; Stauber und Weyerstahl, 2007*).

2.1.4. Diagnostik und Therapie der humanen Endometriose

Oftmals führt bereits eine ausführliche Anamnese der Patientin zur Verdachtsdiagnose „Endometriose“. Gelegentlich können Endometrioseherde bereits während der nachfolgenden gynäkologischen Untersuchung makroskopisch an der Vulva oder Vagina erkennbar sein. Während der Palpation von Abdomen und Becken werden oftmals schmerzhafteste Bereiche identifiziert. Besteht dabei der Verdacht, dass Nachbarorgane des Uterus befallen sind, werden weiterführende Untersuchungen, wie z.B. Zystoskopie oder Koloskopie, notwendig (*Stauber und Weyerstahl, 2007*). Ein wichtiges nicht-invasives Verfahren zur Diagnostik der Endometriose stellt die sonographische Untersuchung dar. Mit dieser Methode lassen sich vor allem Endometrioseherde mit Zysten darstellen, da sich die echoarmen Zysten gut von der Umgebung abgrenzen lassen. Endometrioseherde erscheinen im Ultraschall oft als sphärische, solide Massen mit kleinen Zysten oder überwiegend zystisch mit einem zerstreuten peripheren Echo (*Coleman et al., 1979*). Die direkte Visualisierung der Endometrioseherde während einer Laparoskopie oder -tomie ist jedoch noch immer das sicherste Verfahren zur Diagnosestellung (*Stauber und Weyerstahl, 2007; Baldi et al., 2008*).

Zur Behandlung der Endometriose wurden verschiedene Therapieansätze beschrieben (*Nothnick und D'Hooghe, 2003; Stauber und Weyerstahl, 2007*):

1) Symptomatische Therapie mit Analgetika:

Eine rein symptomatische Schmerztherapie wird durchgeführt, wenn Schmerzen bei der Menstruation im Vordergrund stehen, die Ausprägung der Endometriose aber nur minimal ist. Zum Einsatz kommen hier beispielsweise Cyclooxygenase-Inhibitoren (z.B. Ibuprofen).

2) Kontinuierliche Gabe von Östrogen-Gestagen-Kombinationen:

Durch die kontinuierliche Gabe von Östrogen-Gestagen-Kombinationen in hoher Dosierung wird die Ausschüttung des hypothalamischen Gonadotropin-Releasing Hormons (GnRH) und die daraus resultierende hypophysäre Sekretion des Luteinisierenden Hormons (LH) und des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) unterdrückt. Dies führt bei längerfristiger Anwendung zu einer Amenorrhö bei gleichzeitiger Regression der Endometrioseherde. Diese Form der Behandlung wird zur längerfristigen Nachbehandlung nach operativer Sanierung angewandt. Zum Einsatz kommen hierfür Kontrazeptiva (v.a. gestagenbetonte Präparate).

3) Progestagentherapie:

Durch das negative Feedback applizierter Gestagene auf die hypothalamische Hormonsekretion sinken die Gonadotropinspiegel ebenfalls ab. Dieser Hormonabfall ist hier jedoch nicht so stark ausgeprägt wie unter einer Östrogen-Gestagen-Kombinationstherapie. Als Nebenwirkungen treten Durchbruchblutungen, Übelkeit, Wasserretention, Depressionen und Brustspannen auf. Die Gestagene (z.B. Medroxyprogesteron) werden ebenfalls vor allem nach operativer Sanierung zur Nachbehandlung eingesetzt.

4) Therapie mit Danazol:

Danazol ist ein Derivat des synthetischen Steroids Ethisterone. Der Wirkmechanismus von Danazol ist im einzelnen noch nicht geklärt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die orale Einnahme von Danazol die Hypothalamus-Ovarien-Achse über eine negative Rückkopplung inhibiert, wodurch die hypothalamische GnRH-Ausschüttung unterdrückt wird, so dass ein LH- und FSH-Peak fehlt und folglich die Ovulation ausbleibt (*Franchimont und Cramilion, 1977; Nomura et al., 2006*). Zusätzlich besitzt es starke anti-gonadotrope Eigenschaften (*Dmowski, 1990*), da es die Steroidbiosynthese in den Gonaden und in der Nebennierenrinde hemmt. Peripher zeigt Danazol eine antagonistische Wirkung an Steroidhormonrezeptoren und führt somit auch zur Hemmung von Östrogeneffekten an östrogenabhängigen Zellen. Weiterhin bindet Danazol an Androgen- und Progesteronrezeptoren, was zu einer Suppression der Zellproliferation führt (*Surrey und Halme, 1992; Braun et al., 1994; Tamaoka et al., 2000*). Daneben hemmt es die Aromataseaktivität in Endometriosezellen (*Murakami et al., 2006*). Zusätzlich konnte für Danazol eine

direkte Wirkung an Endometriosezellen nachgewiesen werden, wo es die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Synthese inhibiert und Apoptose induziert (*Igarashi et al., 1998*). Da Danazol sich relativ schlecht in Wasser auflösen lässt, hepatisch metabolisiert wird und eine geringe orale Bioverfügbarkeit aufweist, werden hohe orale Dosen benötigt, um eine effektive Blutkonzentration zu erreichen.

Die Gabe von Danazol ist effektiver als eine Östrogen-Gestagen-Kombinationstherapie. Allerdings treten dabei häufig androgene Nebenwirkungen auf. Hierzu zählen Akne, Seborrhö, Gewichtszunahme, Hirsutismus und Veränderungen der Stimmlage.

5) GnRH-Agonisten:

Die Gabe von GnRH-Agonisten stellt eine wirkungsvolle Therapieform dar. Durch ihre verlängerte Rezeptorbindung an die hypophysären GnRH-Rezeptoren verursachen diese Wirkstoffe einen hypogonadotropen Hypogonadismus. Die Gonadotropin-produzierenden Zellen werden gegenüber einer weiteren Stimulation refraktär und erschöpfen sich auf diese Weise. Dieser Effekt ist jedoch reversibel. Während der Behandlung mit einem GnRH-Agonisten (z.B. Buserelin) bilden sich in ca. 75% aller Fälle die Endometrioseherde zurück.

6) Chirurgische Therapie:

Eine operative Behandlung ist umso eher induziert, je schwerer der Verlauf der Endometriose ist. Hierbei muss zwischen infertilen Patientinnen mit Kinderwunsch und Frauen mit bereits abgeschlossener Familienplanung unterschieden werden, da für ein erfolgreiches chirurgisches Vorgehen sehr häufig eine Ovariectomie erforderlich ist (*Shamsuddin et al., 1979*).

Alle konservativen und organerhaltenden Behandlungskonzepte haben bis heute ein hohes Rezidivrisiko. Die Rezidivraten schwanken dabei in Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung. Nur bei geringgradigen Endometriosen kann eine echte Ausheilung erreicht werden. Während der Einnahme von Medikamenten treten oft starke Nebenwirkungen auf, welche durch den Wirkmechanismus der eingesetzten Wirkstoffe hervorgerufen wird. So zielen die meisten Behandlungsansätze auf eine Reduktion der GnRH-Sekretion ab, wodurch wiederum der Östrogenspiegel im Blut sinkt. Infolgedessen treten eine Vielzahl negativer Folgen,

wie z.B. Osteoporose, auf. Es ist daher von großer Bedeutung, neue Wirkstoffe zur Behandlung der Endometriose zu entwickeln, welche ein geringeres Nebenwirkungsspektrum aufweisen. Hierfür ist es jedoch unerlässlich, die Wirkstoffe zunächst an geeigneten tierexperimentellen Modellen zu testen.

2.2. Tierexperimentelle Modelle in der Endometrioseforschung

2.2.1. Primatenmodelle

Menstruierende Primaten können eine Endometriose entwickeln, die mit der humanen Form vergleichbar ist (*MacKenzie und Casey, 1975; D'Hooghe et al., 1991; Dick et al., 2003*). Allerdings tritt bei diesen Tieren eine Endometriose nur selten spontan auf, so dass man die Entstehung von Endometrioseherden durch das Unterlassen von Trächtigkeiten fördert (*D'Hooghe et al., 1996*). Hierdurch wird der Menstruationszyklus nicht unterbrochen und die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Endometriumfragmente entsprechend der Implantationstheorie nach *Sampson (1927)* retrograd in die Bauchhöhle gelangen. Eine weitere Methode, um das Auftreten von Endometrioseherden zu steigern, stellt die Reposition der Zervix dar, wobei der Menstruationsfluss in das Abdomen umgeleitet wird (*Te Linde und Scott, 1950*). Des Weiteren kann ein vermehrter retrograder Menstruationsfluss durch das Verschließen der Zervix erreicht werden (*D'Hooghe et al., 1994*). Obwohl in der Literatur von elf nicht-humanen Primatenspezies berichtet wird (*Story und Kennedy, 2004*), die spontan eine Endometriose entwickeln können, werden die meisten Studien in Rhesusaffen und Pavianen durchgeführt.

2.2.2. Modell der Chorioallantois-Membran des Hühnereis

Die Chorioallantois-Membran (CAM) ist eine im Hühnerei vorkommende, dünne Membran, welche ein sehr dichtes Mikrogefäßnetzwerk aufweist (*Ribatti et al., 2001*). Während der Entwicklung des Hühnerembryos ermöglicht sie den Sauerstoffaustausch mit der Außenluft (*Schnorr und Kressin, 2001*). Die CAM entsteht durch das Zusammenwachsen zweier mesodermaler Schichten. Eine dieser mesodermalen Schichten ist die Allantois-Membran, die zum ersten Mal am dritten Tag nach der Befruchtung des Eis sichtbar wird und im weiteren Verlauf mit der zweiten Membran, der Chorion-Membran, zusammenwächst.

Um die CAM freipräparieren zu können, wird das befruchtete Hühnerei zunächst für drei Tage bei 37°C und 55% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend werden mit einer 21G Nadel ~2ml Eiweiß entnommen, damit sich die CAM von der Eierschale löst. Dann wird mit einem Mikrobohrer vorsichtig eine runde Fläche (Durchmesser: ~1,5cm) aus der Eierschale gefräst. Um ein Austrocknen des Eis zu verhindern, wird das Loch mit Parafilm abgedeckt. Für die weiteren Untersuchungstage kommt das Ei wieder in den Inkubator.

Da der Hühnerembryo kein vollständig ausgebildetes Immunsystem besitzt, können auf die freipräparierte CAM Xenotransplantate von Säugetieren transplantiert und deren Vaskularisierung im Zeitverlauf analysiert werden. Die Gewebetransplantation sollte hierfür zwischen dem 8. und 12. Tag nach Befruchtung durchgeführt werden. Ein Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit, die Entwicklung neuer Blutgefäße in den Transplantaten wiederholt untersuchen zu können. Jedoch weist das CAM-Modell auch einige Nachteile auf, wie z.B. den limitierten Untersuchungszeitraum von zehn Tagen. *Maas et al. (1999)* nutzte erstmals das CAM-Modell zur Analyse der Vaskularisierung von ektopem Endometriumgewebe als ein neues Endometriosemodell. Seither wurde es in mehreren Studien angewendet, um pathogenetische Mechanismen der Endometriose zu untersuchen (*Malik et al., 2000; Maas et al., 2001*).

2.2.3. Nagermodelle

Da Nagetiere das Endometrium während des ovariellen Zyklus nicht abstoßen, tritt eine Endometriose bei diesen Tieren nicht spontan auf (*Grümmer, 2006*). Genetisch gut definierte Nagermodelle sind jedoch in der Endometrioseforschung von großer Bedeutung, da sie die Möglichkeit bieten, standardisierte Analysen zur Pathogenese und zur Testung neuer Wirkstoffe für die Behandlung dieser Erkrankung durchzuführen. Nagermodelle lassen sich grundsätzlich in heterologe und homologe Modelle unterteilen. Im heterologen Modell erfolgt die Transplantation von humanen Endometrium- bzw. Endometriosefragmenten in immundefiziente Mäuse (*Awwad et al., 1999; Bruner et al., 1997; Nisolle et al., 2000; Grümmer et al., 2001; Eggermont et al., 2005; Hull et al., 2005*). Im Gegensatz dazu erfolgt bei homologen Modellen eine autologe (*Vernon und Wilson, 1985; Dogan et al., 2004; Matsuzaki et al., 2004; Becker et al., 2005; Fainaru et al., 2008*) oder syngene (*Somigliana et al., 1999; Bacci et al., 2009*) Transplantation. Syngen bedeutet, dass Endometrium von einem

Spendertier in ein genetisch identisches Empfängertier transplantiert wird (*Somigliana et al., 1999; Bacci et al., 2009*). Autolog bedeutet dagegen, dass Endometrium aus einem Tier isoliert und anschließend in die Bauchhöhle desselben Tieres transplantiert wird (*Fainaru et al., 2008*). Beide Transplantationsformen können unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Endometrioseherde haben. So ist es im Falle der syngenen Transplantation denkbar, dass Unterschiede im Östrogenspiegel einzelner Tiere das Wachstum der Herde beeinflussen. Die Resektion des Uterushorns im autologen Modell kann dagegen eine chirurgisch induzierte Entzündung im Bauchraum verursachen. Dies kann zu einer unphysiologischen Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit führen, was das Wachstumsverhalten des Endometriumgewebes innerhalb der Bauchhöhle verändert.

Weiterhin können je nach Lokalisation der Transplantate extra- und intraperitoneale Endometriosemodelle unterschieden werden:

1) Extraperitoneale Endometriose

Bei den extraperitonealen Endometriosemodellen werden Endometrioseherde außerhalb der Bauchhöhle durch Transplantation von Endometrium induziert (*Laschke und Menger, 2007; Laschke et al., 2008*). Diese Modelle werden nicht nur an Mäusen (*Cummings und Metcalf, 1995; Somigliana et al., 1999.; Rossi et al. 2000*), sondern auch an Ratten (*Golan et al., 1984; Jones, 1984; Vernon und Wilson, 1985; Rajkumar et al., 1990; Sharpe et al., 1991*) und Hamstern (*Steinleitner et al., 1991*) durchgeführt.

Ein interessantes Beispiel eines solchen Modells ist die Rückenhautkammer. Zur Präparation der Rückenhautkammer wird das narkotisierte Tier rasiert und depiliert, bevor zwei symmetrische Titanrahmen an der aufgespannten Rückenhaut fixiert werden. Anschließend wird eine kreisrunde Hautschicht (Durchmesser: ~15mm) im Bereich eines Beobachtungsfensters, das in einem Titanrahmen lokalisiert ist, herausgeschnitten, so dass die quergestreifte Muskelschicht der Gegenseite sichtbar wird. Diese wird mit einem abnehmbaren Deckglas in dem Beobachtungsfenster des Titanrahmens abgedeckt. Nach einer 48-stündigen Erholungsphase kann Endometriumgewebe in das Beobachtungsfenster transplantiert werden (*Laschke et al., 2005*). Daraus entwickeln sich Endometrioseherde, die über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen mit Hilfe der intravitalen Fluores-

zenzmikroskopie untersucht werden können. Dies ermöglicht Analysen zur Morphologie der Endometrioseherde, zur Mikrohämodynamik sowie zur Ausbildung neuer Blutgefäße und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Herden (*Laschke et al., 2005, 2008, 2011*).

Ein Nachteil des Rückenhautkammer-Modells ist jedoch der relativ kurze Untersuchungszeitraum von höchstens drei Wochen. Für längere Untersuchungszeiträume besteht die Möglichkeit, Endometriumgewebe subkutan in die Maus zu transplantieren. Hierfür wird an der lateralen Bauchseite die Haut inzidiert. Anschließend werden kleine Endometriumstücke in eine subkutane Tasche zwischen Haut- und Muskelschicht transplantiert und die Hautinzision anschließend wieder durch eine Naht verschlossen (*Aoki et al., 1994; Xu et al., 2009*).

2) Intraperitoneale Endometriose

Beim Modell der intraperitonealen Endometriose wird Endometrium in die Bauchhöhle transplantiert. Hierzu wurden in der Vergangenheit verschiedene Techniken beschrieben. So gibt es die Möglichkeit, Endometriumfragmente vorsichtig vom Myometrium abzulösen und anschließend als Suspension in Medium oder Kochsalzlösung in das Abdomen zu injizieren (*Somigliana et al., 1999; Hirata et al., 2005*). Dieser Ansatz hat jedoch den Nachteil, dass es sehr zeitaufwendig ist, die zufällig verteilten Endometrioseherde in der Bauchhöhle zu finden und zu analysieren. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn nicht-invasive Untersuchungstechniken wie Biolumineszenz oder hochauflösende Ultraschallverfahren angewandt werden sollen (*Becker et al., 2006; Laschke et al., 2010*). Um dieses Problem zu umgehen, können Endometrioseherde auch chirurgisch durch Annähen von Uterusgewebestücken induziert werden. Zu diesem Zweck wird ein isoliertes Uterushorn der Länge nach aufgeschnitten und Gewebeproben vergleichbarer Größe mit einer Hautbiopsiestanze entnommen. In diesem Fall enthalten die Stenzen jedoch nicht nur Endometrium, sondern auch das darunterliegende Myometrium und Perimetrium des Uterus (*Vernon und Wilson, 1985; Cummings und Metcalf, 1995*). Entsprechend ist es möglich, dass das Anwachsen der Transplantate durch die räumliche Orientierung des Endometriums bzw. des Myometriums und Perimetriums der Uterusgewebestenzen zum Peritoneum der Bauchwand beeinflusst wird. Weiterhin können sich auch unterschiedliche Transplantatgrößen auf die Entwicklung der Endometrioseherde auswirken.

Das Modell der intraperitonealen Endometriose hat den großen Nachteil, dass zur Analyse des Wachstums der Endometrioseherde zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wiederholte Laparotomien nötig sind. Aus diesem Grund etablierten *Becker et al. (2006)* einen neuen Ansatz, mit dem es erstmals möglich ist, einzelne Herde wiederholt und nicht-invasiv mit Hilfe der Technik der Biolumineszenz zu analysieren. Hierfür wird transgenes Endometriumgewebe von Mäusen, welches Glühwürmchen-Luciferase exprimiert, in die Bauchhöhle von Wildtyp-Mäusen transplantiert. Das Gewebe kann anschließend durch die systemische Injektion des Substrats Luciferin sichtbar gemacht werden. Das Problem bei diesem Ansatz ist jedoch, dass man hierbei auf die Verwendung eines genetisch transfizierten Mausstammes angewiesen ist.

Aus diesem Grund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, erstmals die hochauflösende Ultraschallbildgebung zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell zu validieren. Diese neue Methode ermöglicht die repetitive, nicht-invasive Analyse von Endometrioseherden unabhängig vom verwendeten Mausstamm.

2.3. Sonographie

2.3.1. Physikalisch-technische Grundlagen der Ultraschallbildgebung

Als Ultraschall bezeichnet man in der Physik mechanische Wellen, deren Frequenz außerhalb des Bereichs des menschlichen Hörvermögens liegt. Die Ultraschallbildgebung (Sonographie) wird in der Medizin seit über 50 Jahren zu diagnostischen Zwecken eingesetzt. Hierzu werden Frequenzen von etwa 1-30MHz verwendet (*Lutz, 2007*).

Zur Erzeugung von Ultraschall wird der piezoelektrische Effekt genutzt. Piezoelektrische Kristalle und Keramiken verformen sich beim Anlegen einer elektrischen Spannung. Verwendet man Wechselspannung, verformen sie sich periodisch, so dass mechanische Schwingungen in Form von Ultraschallwellen entstehen. Umgekehrt ist eine elektrische Spannung messbar, wenn die reflektierten Schallwellen von den piezoelektrischen Kristallen empfangen werden und diese dadurch verformt werden. Entsprechend dienen Kristalle im Schallkopf eines Ultraschallgerätes sowohl als Ultraschallsender als auch -empfänger (*Delorme und Debus, 2005*).

Der wichtigste physikalische Parameter eines Schallkopfes ist die Frequenz der in ihm erzeugten Ultraschallwellen. Je niedriger die eingestellte Frequenz ist, umso größer ist das Eindringungsvermögen der Schallwellen in das Gewebe. Im Gegensatz dazu verbessert sich die Feindarstellung der untersuchten Strukturen (Auflösungsvermögen) mit höherer Frequenz. Eindringtiefe und Auflösungsvermögen verhalten sich also entgegengesetzt proportional zueinander. Die Auflösung eines abbildenden Systems wird als der Mindestabstand definiert, der erforderlich ist, um zwei Objekte in der Abbildung gerade noch getrennt wahrnehmen zu können (*Delorme und Debus, 2005*). Hierbei muss zwischen der Auflösung in Schallstrahlrichtung (axiale Auflösung) und der Auflösung quer zum Schallstrahl in der Bildebene (laterale Auflösung) unterschieden werden. Die axiale Auflösung hängt von der Dauer des einzelnen Sendepulses ab. Die Pulslänge selbst ist abhängig von der Wellenlänge und damit von der Frequenz des Ultraschallkopfes, so dass die axiale Auflösung meist im Bereich der doppelten Wellenlänge liegt. Die laterale Auflösung ist abhängig von der Fokussierung in verschiedenen Abschnitten des Bildes. In der Fokuszone erreicht man die beste Auflösung, die etwa 4-5 Wellenlängen beträgt. Dies bedeutet, dass die laterale Auflösung deutlich schlechter ist als die axiale Auflösung eines Schallkopfes (*Delorme und Debus, 2005*).

Ultraschall ist eine Form kinetischer Energie. Die Ultraschallwellen breiten sich dabei in Form von Longitudinalwellen im Gewebe aus. Hierbei werden einzelne Teilchen im Gewebe angeregt. Diese schwingen anschließend längs der Ausbreitungsrichtung der Schallwelle und geben ihrerseits Energie an benachbarte Teilchen weiter. Hierdurch entstehen Bereiche, in denen die Materie eine verminderte oder vermehrte Dichte aufweist (*Poulsen Nautrup und Tobias, 1996*).

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Ultraschallwellen ist in verschiedenen Geweben in Abhängigkeit von der Dichte und Komprimierbarkeit der Gewebe unterschiedlich. So liegt die Ausbreitungsgeschwindigkeit in Knochen bei 3360m/s und in Luft bei 331m/s. Die durchschnittliche Geschwindigkeit in biologischem Gewebe gleicht annähernd der von Wasser, welche ungefähr 1500m/s beträgt (*Delmore und Debus, 2005*).

Ultraschallwellen werden beim Durchlaufen von Gewebe durch Reflexion, Streuung, Brechung, Divergenz und Absorption abgeschwächt, wobei ihr Verhalten in biologischen Geweben den Gesetzen der Akustik unterliegt. *Delmore und Debus (2005)* verstehen unter Reflexion ein Zurückwerfen der Wellen an Grenzschichten.

Trifft eine Ultraschallwelle auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen akustischen Eigenschaften, so wird ein Teil reflektiert. Der reflektierte Anteil ist umso größer, je unterschiedlicher die akustischen Impedanzen der angrenzenden Medien sind. Die akustische Impedanz ist dabei als Produkt aus Dichte und Schallgeschwindigkeit definiert. An einer Grenzfläche zwischen Weichteilgewebe und Knochen wird fast die gesamte eingestrahlte Intensität reflektiert (Totalreflexion). Dadurch kann keine nennenswerte Ultraschallenergie mehr die Grenzfläche durchdringen, so dass Gegenstände hinter dieser Grenzfläche nicht mehr erkannt werden (Schallschatten).

Dieser große Unterschied der Impedanz tritt auch an der Grenzfläche zwischen Luft und Gewebe auf, so dass man Ultraschallgel als Kopplungsmedium zwischen Ultraschallkopf und Gewebe verwenden muss. Eine ungerichtete Reflexion aufgrund von rauen Oberflächen oder Gewebegrenzflächen mit z.B. abgerundeten Konturen wird als Streuung bezeichnet. Davon abzugrenzen ist die Brechung von Schallwellen, die besonders an glatten Grenzflächen mit hoher akustischer Impedanz auftritt. Man versteht darunter eine Änderung der Ausbreitungsrichtung von Wellen beim Durchgang durch die Grenzfläche zweier Medien, in denen sie verschiedene Ausbreitungsgeschwindigkeiten besitzen (*Delmore und Debus, 2005; Schmidt, 2005*). Unter Divergenz versteht man das Auseinanderlaufen von Schallwellen, die aus einer punktförmigen Licht- bzw. Schallquelle stammen, mit zunehmender Entfernung von der Quelle (*Delorme und Debus, 2005; Poulsen Nautrup und Tobias, 1996*). Beim Durchgang der Schallwellen durch das Gewebe wird ein Teil der kinetischen Energie als Wärme an das umliegende Gewebe abgegeben (Absorption). Dabei verstärkt sich die Wärmeentwicklung mit der Zunahme der verwendeten Frequenz. Aufgrund der Wärmekonvektion innerhalb des Gewebes wird diese maximale Temperaturerhöhung jedoch begrenzt. Weiterhin kann abhängig vom Durchblutungsgrad des Gewebes die erzeugte Wärme direkt über das Blutgefäßsystem abtransportiert werden (*Lutz, 2007*).

Beim Ultraschall erfolgt die Bildwiedergabe amplituden- (A-Mode), helligkeits- (B-Mode) oder bewegungsmoduliert (M-Mode). Im A-Mode werden die reflektierten Echos in Form von unterschiedlich hohen Amplituden proportional zur Intensität und Laufzeit angezeigt (*Noce, 1990; Taylor, 1996*). Beim B-Mode (Brightness-Mode) wird die Stärke des Reflexes in einen Bildpunkt mit entsprechender Helligkeit umgewandelt. So wird ein starker Reflex weiß (echoreich) und ein schwacher Reflex schwarz

(echoarm) angezeigt. Der M-Mode eignet sich besonders zur Darstellung von Organen in Bewegung und wird in der Herzsonographie eingesetzt (*Schumacher et al., 2008*). Bei den heutigen Real-Time-Schallköpfen wird das Bild durch einen rotierenden Schallkopf (mechanischer Schallkopf), eine sequenzielle elektronische Ansteuerung der einzelnen Schallelemente (elektronischer Schallkopf) oder durch eine Kombination mechanischer und elektronischer Bauelemente erzeugt. So werden in rascher Folge die Bilder aktualisiert und somit die Darstellung von Bewegungen des Gewebes möglich.

2.3.2. Dreidimensionale Ultraschallbildgebung

Voraussetzung für die Erstellung eines dreidimensionalen Ultraschallbildes ist die Möglichkeit, viele zweidimensionale Bilder per Computer zu einem dreidimensionalen Bild zu rekonstruieren. Hierzu müssen die zweidimensionalen Bilder in regelmäßigen, parallelen Abständen aufgenommen werden. Der Ultraschallkopf wird hierzu mit einem Motor kombiniert, der die Ablenkung in der dritten Dimension mechanisch durchführt (*Downey et al., 2000; Sakas et al., 2000; Fenster und Downey, 2003*).

Nach der Rekonstruktion eines dreidimensionalen Ultraschallbildes kann direkt im Anschluss eine Volumenmessung der zu untersuchenden Objekte durchgeführt werden. Eine Möglichkeit hierfür ist die zweidimensionale Volumenbestimmung der Objekte durch die Messung in drei senkrecht zueinander stehenden Ebenen. Dabei werden Länge (l), Breite (b) und Tiefe (t) der auszumessenden Objekte bestimmt und das Volumen nach der Ellipsoidformel $V = l \times b \times t \times \pi/6$ berechnet (*Lang et al., 1999*). Im Gegensatz dazu kann die Genauigkeit der dreidimensionalen Volumensmessungen durch eine Planimetrie von zweidimensionalen Ultraschallbildern und deren anschließender Interpolation noch deutlich verbessert werden (*Gilja et al., 1999*). Dies konnte in Studien im Wasserbad durch die Berechnung der Wasserverdrängung gezeigt werden (*Liess et al., 1994; Riccabona et al., 1996a; Wong et al., 1996; Lang et al., 1999*). Um dieses Verfahren in der Humanmedizin zu etablieren, wurde sowohl die Blase (*Riccabona et al., 1996b*) als auch die Prostata als Organ verwendet (*Elliot et al., 1996; Tong et al., 1998*). Des Weiteren konnte der Volumenvergleich von Rattennieren in vivo und in vitro zeigen, dass die dreidimensionale Volumetrie eine neue Möglichkeit der Volumenbestimmung bei kleinen Haustieren darstellt (*Strommen et al., 2004*). *Wirtzfeld et al. (2005)* beschrieben erstmals die dreidimensionale Volumenmessung von Prostatatumoren im Mausmodell mittels des

hochauflösenden Ultraschallsystems Vevo770. Folglich können mit diesem Ultraschallgerät repetitive und nicht-invasive Volumenmessungen durchgeführt und valide Aussagen über Gewebewachstum im Mausmodell getroffen werden (Saar et al., 2010).

2.4. Ziel der Studie

Die in der Humanmedizin eingesetzten Ultraschallgeräte mit einer Frequenz von meist 7,5-10MHz haben eine große Eindringtiefe bei relativ geringem Auflösungsvermögen. Demzufolge war es bislang nicht möglich, kleinste Strukturen im Mausmodell mittels der konventionellen Ultraschalltechnik zu detektieren. Durch die Verwendung des hochauflösenden Ultraschallgerätes Vevo770 mit einem 40MHz Ultraschallkopf kann erstmals eine Auflösung von 30µm in einer Fokustiefe von 6mm erreicht werden. Entsprechend müsste es möglich sein, Endometrioseherde im Mausmodell nicht-invasiv und repetitiv über einen längeren Zeitraum mit dieser Technik zu analysieren. Hierdurch könnten die Zahl der verwendeten Mäuse im Tierexperiment deutlich reduziert und dabei gleichzeitig wesentlich mehr Ergebnisse aus individuellen Tieren gewonnen werden.

Folgende Fragestellungen sollten daher in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Ist die Darstellung von intraperitonealen Endometrioseherden mit ihrem Stroma- und Zystenanteil im Mausmodell mittels hochauflösender Ultraschallbildgebung möglich?
2. Wie aussagekräftig sind die Volumenmessungen von Endometrioseherden im Mausmodell mittels Ultraschall?
3. Wie korrelieren die Ultraschall-Volumenmessungen mit den herkömmlichen Messmethoden (Messschieber und Histologie) zur Volumenbestimmung von Endometrioseherden?

4. Hat der Transplantationsmodus, die räumliche Orientierung und die Größe isolierter Uterusgewebestücke Auswirkungen auf das Wachstum der sich daraus entwickelnden Endometrioseherde in der Bauchhöhle?

5. Kann in einem subperitonealen Endometriosemodell im Vergleich zum konventionellen intraperitonealen Endometriosemodell ein homogeneres, hormonabhängiges Wachstum von Endometrioseherden erzielt werden?

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Alle Versuche wurden an 12 bis 16 Wochen alten weiblichen C57BL/6-Mäusen am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) durchgeführt. Sie hatten ein Gewicht von 20 bis 25g und wurden in Einzelkäfigen in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag- / Nachtrhythmus gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardpelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland). Sämtliche Versuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz (Saarbrücken) genehmigt.

3.2. Vaginale Zyklusbestimmung

Um Unterschiede der Ergebnisse zwischen einzelnen Tieren aufgrund des Zyklusstadiums ausschließen zu können, wurden nur Tiere verwendet, die sich zum Zeitpunkt der Endometriumtransplantation im Östrus befanden.

Zur Bestimmung des Zyklusstadiums wurden bei allen Tieren zunächst 15µl einer 0,9%-igen Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zwei- bis dreimal vorsichtig in die Vagina der wachen Tiere pipettiert. Direkt im Anschluss wurde die Vaginallavage auf einen Objektträger transferiert und unter einem Mikroskop (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Hierbei konnten die vier aufeinanderfolgenden Stadien Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus durch die Verteilung verschiedener Zelltypen des Vaginalepithels unterschieden werden (*Dalal et al., 2001; Caligioni, 2009*). Das Vaginalepithel besteht aus einer unteren Basalschicht, die aus runden basophilen Zellen mit einem großen Zellkern besteht. Diese dienen zur Regeneration des Vaginalepithels. In der darüber liegenden Schicht befinden sich die Parabasalzellen, die ebenfalls rund und basophil sind. In der nächsten Schicht findet man die polygonalen Intermediärzellen, die ihre Kerne im Zyklusverlauf verlieren, so dass man dann von kernlosen Superficialzellen spricht (*Junqueira und Carneiro, 1996; Liebich, 1998*).

Die Vaginalzytologie des Proöstrus zeichnet sich durch das gehäufte Vorkommen von Intermediärzellen aus. Parabasalzellen treten in verminderter Anzahl auf, da diese aus tieferen Schichten des Vaginalepithels stammen.

Leukozyten findet man zu diesem Zeitpunkt kaum in der Zytologie (Abb. 1A). Ein vermehrtes Auftreten von Superficialzellen zeigt den Übertritt zum Östrusstadium, in dem sich kernlose Schollen zusammenlagern. Im Östrus sind nur wenige Parabasal- und Intermediärzellen und keine Leukozyten vorhanden (Abb. 1B). Der Metöstrus ist durch ein zelluläres Mischbild mit überwiegend Leukozyten charakterisiert. Es sind allerdings immer auch noch Schollen vorhanden (Abb. 1C). Im Diöstrus besteht die Vaginalzytologie bis zu 100% aus Leukozyten (Abb. 1D).

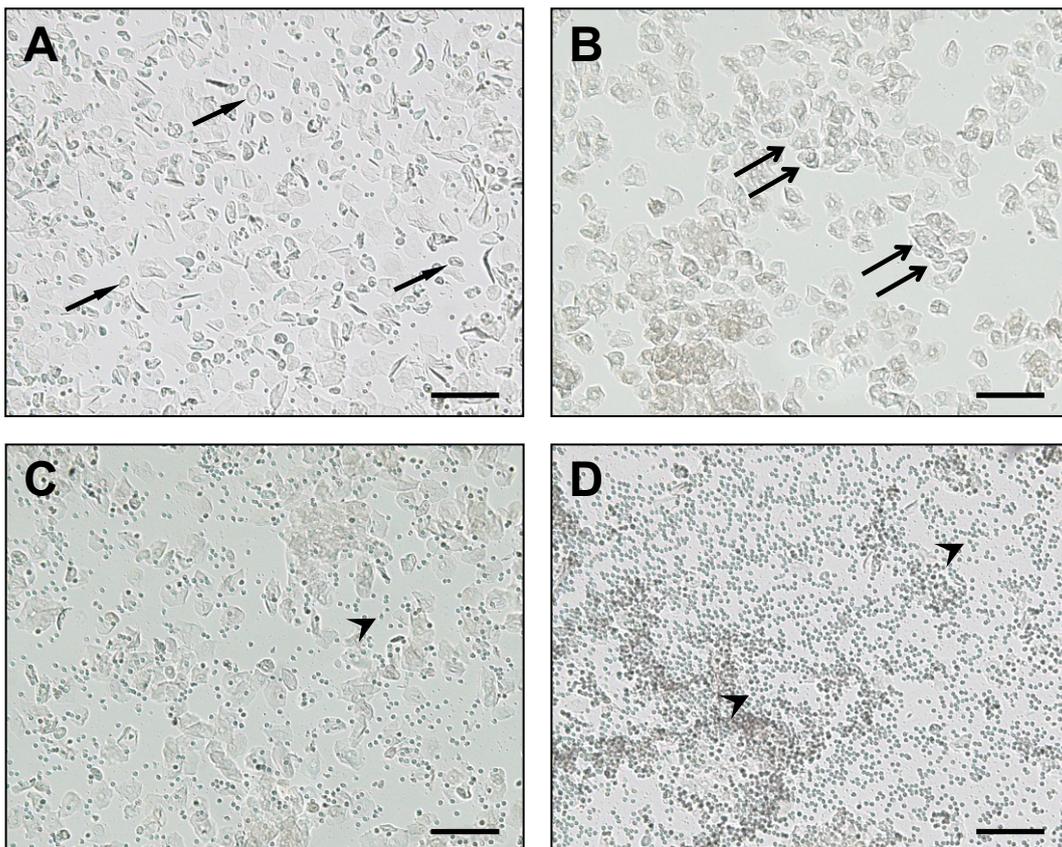


Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von ungefärbten Vaginalzytologien einer C57BL/6-Maus, die über vier Tage gewonnen wurden. (A) Proöstrus mit überwiegendem Vorkommen von Intermediärzellen (**Pfeile**). (B) Östrus mit kernlosen Superficialzellen (**Doppelpfeile**). (C) Metöstrus mit zellulärem Mischbild, das vorwiegend Leukozyten (**Pfeilspitze**) enthält. (D) Diöstrus mit fast ausschließlichem Vorkommen von Leukozyten (**Pfeilspitzen**). Skalierung: 120µm.

3.3. Induktion von Endometrioseherden

3.3.1. Isolierung von Uterusstanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden Endometrioseherde chirurgisch durch Transplantation von Uterusstanzen aus Spendermäusen in die Bauchhöhle von

Empfängermäusen induziert. Die Narkose der Spendermaus erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75mg/kg Körpergewicht (KG); Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) und Xylazin (15mg/kg KG; Rompun; Bayer, Leverkusen, Deutschland). Nach Desinfektion (Softasept N; B. Braun Melsungen AG) der Bauchhaut wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Anschließend wurde das linke Uterushorn (für die autologe Transplantation) oder die beiden Uterushörner (für die syngene Transplantation) an den Tuben und der Bifurcatio uteri abgesetzt und direkt in eine Petrischale mit 37°C warmen Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum, 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin; PAA, Cölbe, Deutschland) transferiert (*Abb. 2A*). Danach erfolgte die longitudinale Eröffnung der Uterushörner mit einer Mikroschere unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) (*Abb. 2B*). Anschließend wurden je nach Versuchsgruppe mit Hilfe einer 2mm- bzw. 3mm-Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) Uterusfragmente ausgestanzt und in eine mit DMEM gefüllte Petrischale überführt (*Abb. 2C*).

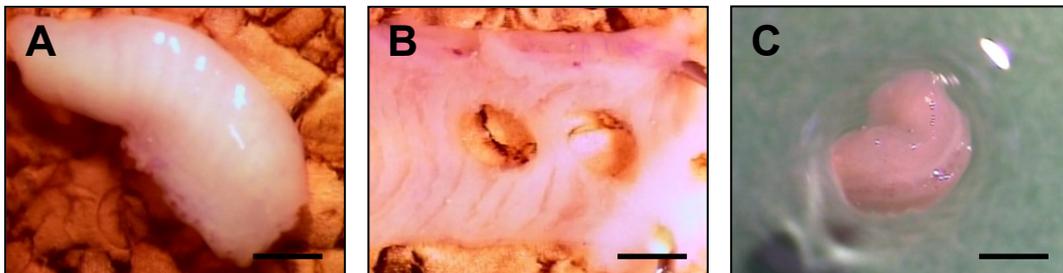


Abbildung 2: Isolation von Uterusstanzen zur chirurgischen Induktion intraperitonealer Endometrioseherde. **A:** Isoliertes Uterushorn einer C57BL/6-Maus in DMEM. **B-C:** Das longitudinal eröffnete Uterushorn wird auf sterilem Kork aufgespannt und anschließend werden 2mm große Uterusfragmente ausgestanzt (**B**). Diese werden in eine mit DMEM gefüllte Petrischale transferiert (**C**). Skalierung: A, B = 1,9mm; C = 1,2mm.

Nach der Isolation der Uterusstanzen wurden Endometrioseherde sowohl intraperitoneal als auch subperitoneal, wie in den folgenden *Kapiteln* 3.3.2. und 3.3.3. beschrieben, induziert.

3.3.2. Induktion intraperitonealer Endometrioseherde

Zur Induktion intraperitonealer Endometrioseherde wurden isolierte Uterusstanzen in die Bauchhöhle von Empfängertieren transplantiert. Hierzu wurden Empfängertiere

mit einer intraperitonealen Injektion Ketamin (75mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Dann wurde das Fell im Bauchbereich der Mäuse mit Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp., Mississauga, ON, Kanada) entfernt und die Bauchhaut mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Nach Eröffnen des Abdomens entlang der Linea alba konnten die Uterustanzen mit einem 7-0 Prolenefaden (Ethicon Produkte, Norderstedt, Deutschland) am lateralen Peritoneum der Bauchwand des Empfängertieres fixiert werden (Abb. 3).

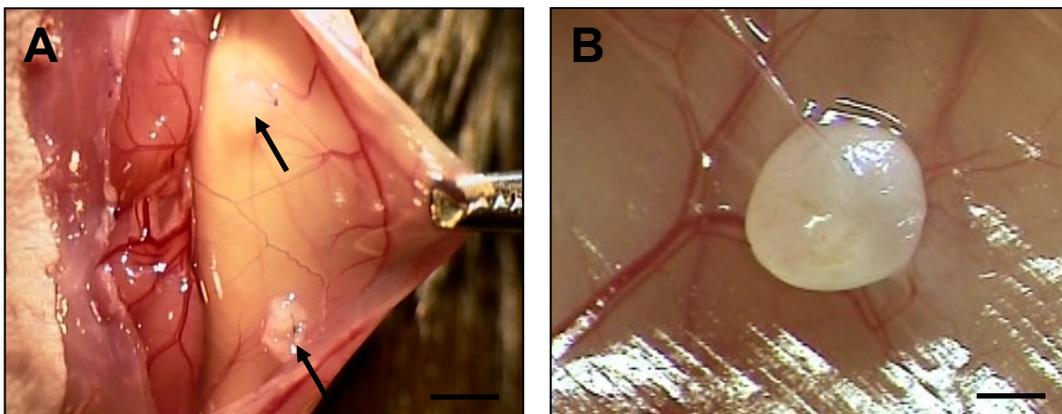


Abbildung 3: Chirurgische Induktion intraperitonealer Endometrioseherde. **A:** Angenähete 2mm-Uterustanzen an der Bauchwand des Empfängertieres (**Pfeile**) am Tag der Transplantation. **B:** Endometrioseherd nach 4 Wochen. Skalierung: A = 2,2mm; B = 0,4mm.

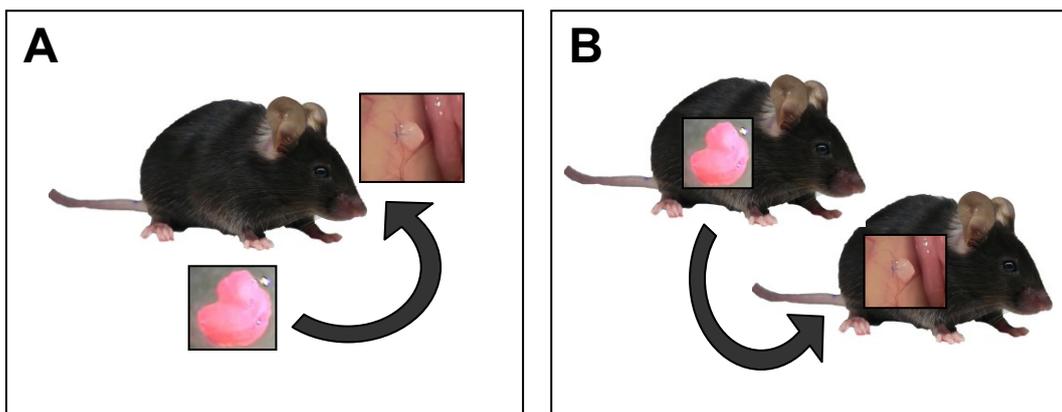


Abbildung 4: Unterschiedliche Transplantationsmodi zur chirurgischen Induktion intraperitonealer Endometrioseherde. **A:** Bei der autologen Transplantation dient das Spendertier der Uterustanzen gleichzeitig als Empfängertier. **B:** Bei der syngenen Transplantation werden die Uterustanzen aus einem Spendertier isoliert und bei einem genetisch identischen Empfängertier an der Bauchwand fixiert.

Je nach Versuchsgruppe wurden die Uterustanzen autolog oder syngene transplantiert. Zur autologen Transplantation wurden die Uterustanzen aus dem

linken Uterushorn des Versuchstieres isoliert und an der Bauchwand desselben Tieres fixiert (Abb. 4A). Zur syngeneten Transplantation wurden Uterusstanzen aus einem Spendertier in ein genetisch identisches Empfängertier transplantiert (Abb. 4B).

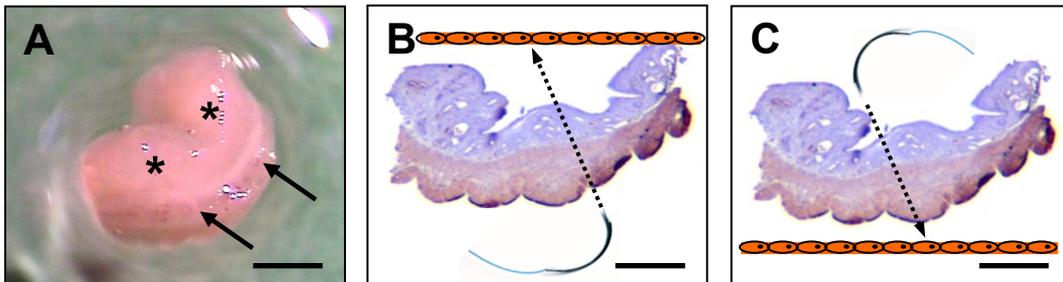


Abbildung 5: Makroskopische Ansicht (A) und immunhistochemisch gefärbte Schnitte (B und C) einer Uterusstanze, die aus dem Uterushorn einer C57BL/6-Maus mit Hilfe einer 2mm-Biopsiestanze isoliert wurde. A: Makroskopisch ist bereits eine Differenzierung des Endometriums (**Sternchen**) vom Myometrium (**Pfeile**) mit dem darunterliegenden Perimetrium möglich. B und C zeigen die Einstichrichtung der Nadel, die notwendig ist, um die Uterusstanze mit dem Endometrium (B) oder dem Perimetrium (C) in direktem Kontakt zum Peritoneum (schematisch in orange) der Bauchwand zu fixieren. Immunhistochemische Färbung des Myometriums mit α -smooth muscle actin (α -SMA). Skalierung: A = 0,8mm; B, C = 0,4mm.

Da die isolierten Uterusstanzen sowohl aus Endometrium als auch Myometrium und Perimetrium bestanden (Abb. 5A), wurde in einzelnen Versuchsgruppen zusätzlich der Einfluss dieser Gewebeschichten auf das Wachstumsverhalten der sich entwickelnden Endometrioseherde untersucht. Hierzu wurden die isolierten Uterusstanzen entweder mit dem Endometrium oder dem Perimetrium in direktem Kontakt zum Peritoneum der Bauchwand fixiert (Abb. 5B und C). Danach wurde die Laparotomie wieder mit einer fortlaufenden Muskel- und Hautnaht (6-0 Prolenefaden) verschlossen.

3.3.3. Induktion subperitonealer Endometrioseherde

Zur Induktion subperitonealer Endometrioseherde wurden die isolierten Uterusstanzen unter das Peritoneum der Empfängertiere geschoben. Hierzu wurden die Empfängertiere mit einer intraperitonealen Injektion Ketamin (75mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Dann wurde das Bauchfell der Mäuse mit Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion;

Church & Dwight Canada Corp.) depiliert und die Bauchhaut anschließend mit 70%-igem Alkohol desinfiziert.

Nach Eröffnen des Abdomens entlang der Linea alba wurde mit Hilfe des Stahl-Mandrins einer 18G-Braunüle (BD Venflon Pro Safety; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) ein Tunnel unter das laterale Peritoneum gestochen (Abb. 6A). Die Einstichstelle wurde im Anschluss mit einer Mikroschere vorsichtig erweitert, um anschließend eine 2mm große Uterusstanze mit einer geraden Mikropinzette in den subperitonealen Tunnel einzuschieben (Abb. 6B-D). Eine Fixierung des Gewebes mit einer Naht war bei Verwendung dieser Technik nicht erforderlich. Auf diese Weise wurden jeweils 2 Uterusstanzen pro Tier (1 Stanze pro Bauchseite) syngen transplantiert. Am Ende wurde die Laparotomie wieder mit einer fortlaufenden Muskel- und Hautnaht (6-0 Prolenefaden) verschlossen.

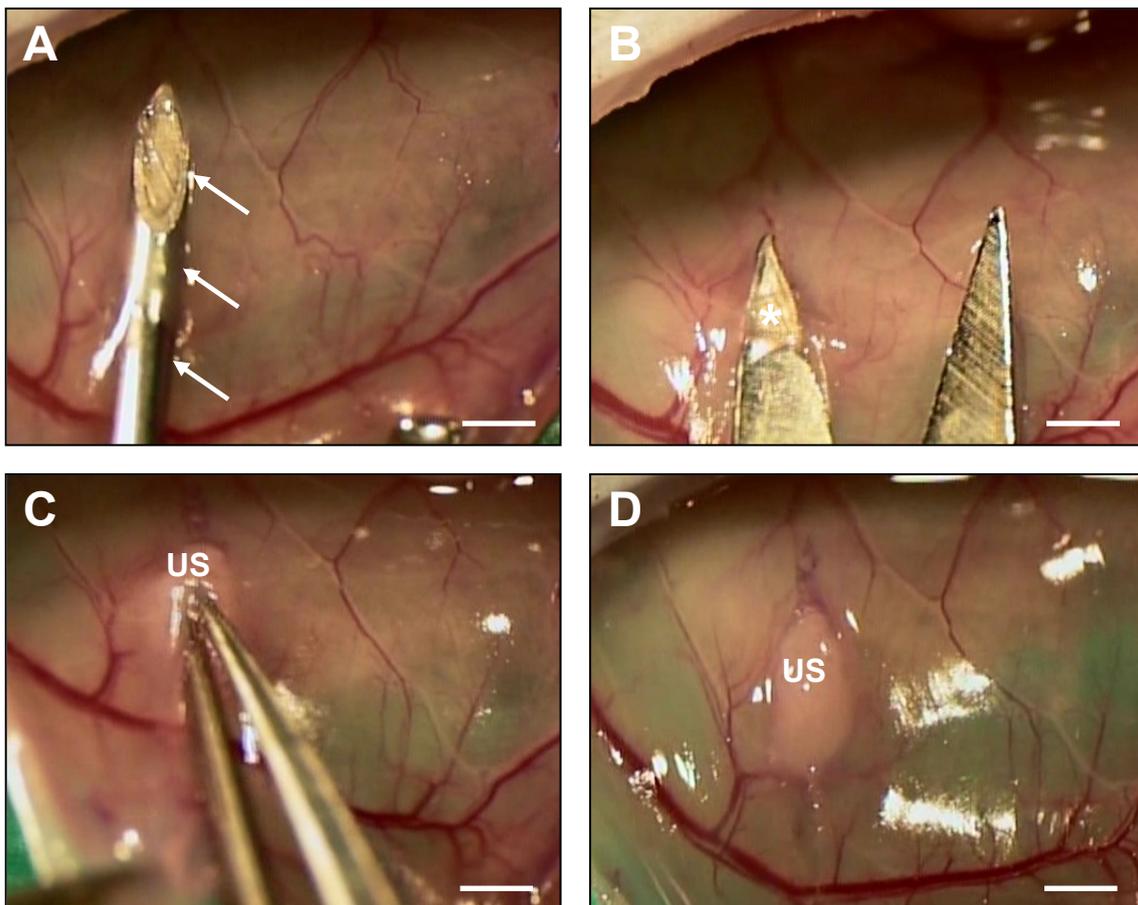


Abbildung 6: A-D: Chirurgische Induktion subperitonealer Endometrioseherde. Nach medianer Laparotomie wird mit dem Stahl-Mandrin einer Braunüle ein subperitonealer Tunnel gestochen (A; Pfeile) und die Einstichstelle mit einer Mikroschere erweitert (B; Stern). Anschließend wird eine 2mm-Uterusstanze (C, D; US) mit einer Mikropinzette in den vorgefertigten Tunnel geschoben (C), die schließlich vollständig vom Peritoneum überdeckt ist (D). Skalierung: 1,2mm.

3.4. Hemmung des Wachstums subperitonealer Endometrioseherde

3.4.1. Chirurgische Behandlung durch Ovariectomie

Um in der vorliegenden Arbeit den hormonellen Einfluss auf das Wachstumsverhalten subperitonealer Endometrioseherde zu untersuchen, wurde in einer Versuchsgruppe eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion Ketamin (75mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Dann wurde das Fell im Bauchbereich der Mäuse mit Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp.) entfernt und die Bauchhaut anschließend mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Nach Eröffnen des Abdomens entlang der Linea alba wurde unter Verwendung eines Stereo-Operationsmikroskops zuerst das rechte Uterushorn und Ovar dargestellt. Die Arteria und Vena ovarica dextra sowie kleinere Gefäßäste zwischen Ovar und Tube bzw. Ovar und Uterus wurden durch Elektrokauterisierung (Erbe Kauter B; Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland) verschlossen. Nach vollständiger Unterbindung der Blutversorgung wurde das Ovar in toto entnommen. Die Entfernung des linken Ovars erfolgte auf die gleiche Weise. Schließlich wurde der Bauchraum mit 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung gespült. Die Laparotomie wurde anschließend wieder mit einem 6-0 Prolenefaden in fortlaufender Naht der Muskel- und Hautschicht verschlossen. Die Tiere konnten sich von dem Eingriff für 14 Tage erholen, bevor die Induktion subperitonealer Endometrioseherde erfolgte.

3.4.2. Behandlung mit Danazol

Danazol inhibiert die Hypothalamus-Ovarien-Achse (Franchimont und Cramilion, 1977; Nomura et al., 2006). Durch die Unterdrückung der GnRH-Ausschüttung fällt folglich der Östrogenspiegel im Blut ab (Wood et al., 1975). Um den Einfluss dieser anti-östrogenen Therapie auf das Wachstumsverhalten subperitonealer Endometrioseherde untersuchen zu können, wurde eine Versuchsgruppe täglich mit Danazol behandelt. Beim Menschen wird Danazol zur Therapie der Endometriose in einer Dosierung von 8mg/kg KG eingesetzt (Wingfield und Healy, 1993). Eine vergleichbare Wirkstoffkonzentration zur Therapie der Endometriose im Mausmodell kann mit der Formel $HED (mg/kg) = MD (mg/kg) \times (k_m \text{ der Maus} / k_m \text{ des Menschen})$

berechnet werden (*Reagan-Shaw et al., 2008*). Hierbei stellt HED die eingesetzte humane Wirkstoffkonzentration und MD die vergleichbare Maus-Dosis dar. K_m ist ein festgelegter Faktor (*Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, 2002*) für die jeweilige Spezies zur Berechnung der Dosis basierend auf der Körperoberfläche und nicht dem Körpergewicht. Demzufolge wurde im Mausmodell eine Danazol-Konzentration von 100mg/kg KG verabreicht. Hierzu wurden 100mg Danazol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS; pH 7,2) in einer Konzentration von 10mg/ml suspendiert (*Zhang et al., 2008*). Nach einer Kurznarkose mit 4Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) wurde die Suspension in einer Dosierung von 100mg/kg KG mit einer Knopfkanüle (gerade; 1,2x60mm; Henry Schein Vet GmbH, Hamburg, Deutschland) den Mäusen einmal täglich intragastral appliziert.

3.5. Hochauflösende Ultraschall-Analyse von Endometrioseherden

Die induzierten Endometrioseherde sämtlicher Versuchsgruppen wurden am Tag der Transplantation der Uterusfragmente (Tag 0) sowie am 7., 14., 21. und 28. Tag mit dem hochauflösenden Ultraschallsystem Vevo770 (VisualSonics, Toronto, Kanada) analysiert. Hierzu wurden die Versuchstiere zunächst mit 4Vol-% Isofluran in 100% Sauerstoff in einer Plexiglasbox narkotisiert. Die Tiere wurden dann in Rückenlage auf einem 40°C beheizten Tisch fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte die Begasung über eine Atemmaske mit 2Vol-% Isofluran. Das Monitoring der Vitalparameter erfolgte über Tisch-Elektroden (THM100; Indus Instruments, Houston, TX, USA), mit denen die Herz- und Atemfrequenz der Tiere überwacht wurden. Vor der eigentlichen Untersuchung wurde Ultraschallgel (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) auf das enthaarte Abdomen aufgetragen.

Die Ultraschalluntersuchung erfolgte mit einem 704RMV (real-time micro-visualization) Ultraschallkopf (VisualSonics) mit einer Frequenz von 40MHz und einer Fokustiefe von 6mm. Der Ultraschallkopf wurde mit Hilfe eines linearen Motors zur Erstellung dreidimensionaler Aufnahmen über die gesamte Länge der analysierten Endometrioseherde gefahren (*Abb. 7A*). In einem einheitlichen Schnittabstand von jeweils 50µm wurden parallele, zweidimensionale Ultraschallbilder aufgezeichnet. Diese wurden anschließend von einer speziellen Software (Vevo770 V2.3.0;

VisualSonics) zu einem dreidimensionalen Bildwürfel rekonstruiert (Abb. 7B). Die Untersuchung und Aufnahme sowie die Rekonstruktion (Abb. 7C) der dreidimensionalen Bilder dauerte im Durchschnitt nicht länger als 20s pro Herd.

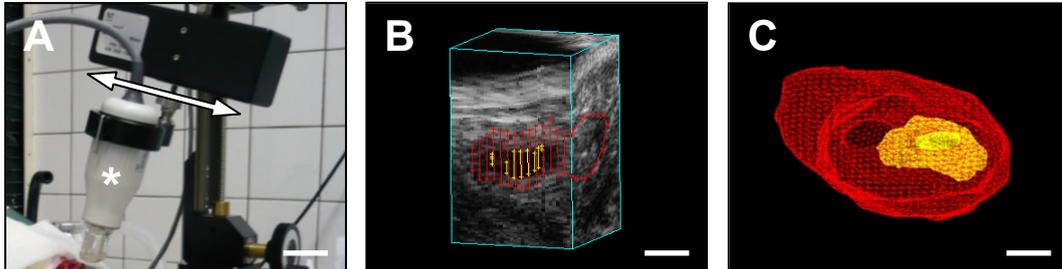


Abbildung 7: Dreidimensionale Rekonstruktion eines Endometrioseherdes mittels hochauflösendem Ultraschall. **A:** Der 40MHz-Ultraschallkopf (**Stern**) wird von einem linearen Motor (**Pfeil**) über den gesamten Endometrioseherd gefahren. **B:** Dreidimensionaler Bildwürfel eines Endometrioseherdes (**B; rot**) und seiner Zyste (**B; gelb**). Sowohl der Herd als auch die darin enthaltene Zyste wurden manuell im Abstand von 50 μ m ausgemessen. **C:** Entsprechende dreidimensionale Rekonstruktion des Endometrioseherdes (**C; rot**) und seiner Zyste (**C; gelb**). Skalierung: A = 40mm; B = 1mm; C = 0,5mm.

Die quantitative Analyse der Ultraschalldaten wurde mit der Vevo770 System Software Version 2.3.0 von VisualSonics durchgeführt. Die Analyse umfasste die Auswertung des Gesamtvolumens der Endometrioseherde, ihrer Zysten und ihres Stromas (jeweils in mm³). Hierfür wurden in definierten, parallelen Ebenen die Grenzen der Herde sowie ihrer Zysten manuell umfahren. Basierend auf den umrandeten Flächen erfolgte die Berechnung des Volumens und die dreidimensionale Darstellung der Endometrioseherde durch die VisualSonics-Software (Abb. 7C).

In einem Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die berechneten Volumina, die auf unterschiedlich gewählten Schnittabständen von 50 μ m, 100 μ m, 200 μ m, 400 μ m und 500 μ m basierten, miteinander verglichen. Hierbei sollte der Einfluss unterschiedlicher Schnittabstände auf die Genauigkeit der Volumenmessung der Endometrioseherde untersucht werden. In einem weiteren Studienabschnitt wurde die Intra- und Interobserver-Variabilität der sonographischen Volumenmessungen bestimmt. Die Volumenmessung der Endometrioseherde zur Bestimmung der Intraobserver-Variabilität wurde vom gleichen Untersucher im Abstand von einem Monat durchgeführt. Zur Untersuchung der Interobserver-Variabilität wurden die Endometrioseherde von drei Untersuchern unabhängig voneinander ausgemessen.

Im Anschluss wurde die Intra- und Interobserver Variabilität in unterschiedlichen Streudiagrammen dargestellt (Kap. 3.6.).

3.6. Konventionelle Verfahren zur Volumenbestimmung von Endometrioseherden

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Messmethoden auf die Volumenbestimmung von Endometrioseherden untersucht. Hierzu erfolgte ein Vergleich der gemessenen Ultraschallvolumina mit den berechneten Volumina aus Messschieber- und Histologie-Analysen.

Nach der letzten Ultraschalluntersuchung am 28. Untersuchungstag wurden hierzu die Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion Ketamin (75mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Nach medianer Laparotomie unter einem Stereo-Operationsmikroskop wurden die Herde mit Hilfe eines digitalen Messschiebers (0-150mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland) vermessen. Sowohl der längste als auch der senkrecht dazu verlaufende kürzeste Durchmesser der Endometrioseherde wurde bestimmt. Das Volumen wurde dann mittels der Ellipsoidformel $V = d_1^2 \times d_2 \times \pi/6$ berechnet. Hierbei entsprach d_1 dem kürzeren und d_2 dem längeren Durchmesser (*Tomayko und Reynolds, 1989*).

Unmittelbar nach der Messschiebermessung wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (200mg/kg i.v.; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) getötet und die Endometrioseherde mit dem sie umgebenden Gewebe entfernt. Um eine identische Ausrichtung der Endometrioseherde in den Ultraschallaufnahmen und den späteren Histologieschnitten gewährleisten zu können, wurden die Gewebeproben an einer Seite mit 6-0 Prolenefaden markiert. Nach einer 48-stündigen Formalinfixierung wurden 5µm dicke Serien-Gewebeschnitte (Mikrotom, Leica SM 2000R, Solms, Deutschland) angefertigt. Im Anschluss erfolgte eine Standardfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Jedes zehnte histologische Präparat (50µm-Intervall) wurde unter einem Lichtmikroskop (BX60; Olympus) analysiert und auf eine DVD mittels einer AxioCam (Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen. Dann erfolgte die Auswertung mit dem Computer mit Hilfe der Software CapImage (Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Hierzu wurden die Flächen der Endometrioseherde auf den einzelnen Histologieschnitten ausgemessen. Zur Volumenberechnung der Herde wurde die Formel für die trapezoide Interpolation $V = \frac{1}{2} \times (A + B) \times d$ verwendet.

3. Material und Methoden

Hierbei war A die ausgemessene Fläche eines Endometrioseherdes auf einem Histologieschnitt. B war die ausgemessene Fläche des Herdes auf dem folgenden Histologieschnitt und d der Abstand zwischen den beiden Schnitten (50µm). Die Summe aller auf diese Weise errechneten trapezoiden Volumina eines Endometrioseherdes entsprach seinem Gesamtvolumen.

Tabelle 1: Beispiel zur Berechnung der Daten für die Erstellung von Streudiagrammen.

(I) Ultraschall- Volumen [mm ³]	(II) Messschieber- oder Histologie- Volumen [mm ³]	(III) mittleres Herd- Volumen [mm ³] (I + II) / 2	(IV) Volumen- differenz [mm ³] II – I	(V) Abweichung [%] I versus II 100 x (I – II) / I
1,2	1,5	1,4	0,3	-25,0
2,0	2,0	2,0	0,0	0,0
3,2	3,6	3,4	0,4	-12,5
4,0	6,0	5,0	2,0	-50,0
5,8	4,5	5,2	-1,3	22,4
6,4	7,8	7,1	1,4	-21,9
7,4	6,9	7,2	-0,5	6,8
8,0	6,0	7,0	-2,0	25,0
9,3	9,7	9,5	0,4	-4,3

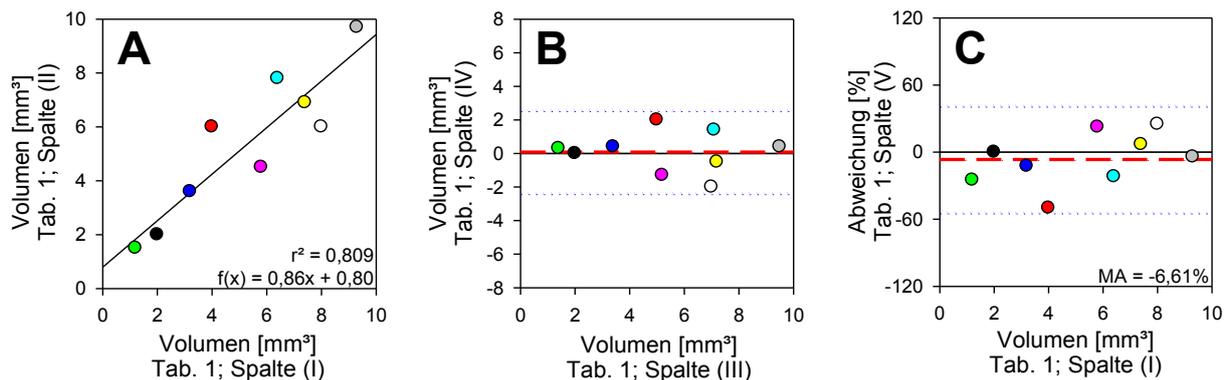


Abbildung 8: Streudiagramme zum Vergleich verschiedener Messmethoden. **A:** Streudiagramm mit Regressionsgerade ($f(x) = 0,86x + 0,80$) und dazugehörigem Korrelationskoeffizienten $r^2 = 0,809$. **B:** Bland-Altman-Diagramm mit dem Mittelwert der Differenzen (B; rot gestrichelte Linie) und der doppelten Standardabweichung (B; blau gepunktete Linien). **C:** Streudiagramm mit der prozentualen Abweichung zwischen der ersten und zweiten Messmethode. Im Diagramm ist der Mittelwert der prozentualen Abweichung (C; MA = -6,61%; rot gestrichelte Linie) sowie die doppelte Standardabweichung (blau gepunktete Linien) eingezeichnet.

Die Messergebnisse aus Ultraschall-, Messschieber- und Histologie-Auswertung wurden in einem Streudiagramm dargestellt. Hierbei wurden die Ultraschallwerte (Tab. 1; Spalte I) auf der x-Achse und die Messschieber- bzw. Histologiewerte (Tab. 1; Spalte II) auf der y-Achse aufgetragen (Abb. 8A). Zur Berechnung der Korrelation zweier Messtechniken wurde eine Regressionsgrade ($f(x) = ax + b$) bestimmt. Der dazu gehörige Korrelationsfaktor (r^2) stellte einen Faktor dar, der angab, wie dicht sich die Punktwolke aller gemessenen Ergebnisse um die Gerade verteilte.

Die Übereinstimmung zweier Untersuchungstechniken wurde anschließend mit Hilfe eines Bland-Altman-Diagramms (Abb. 8B) analysiert. In diesem Diagramm werden auf der x-Achse die Mittelwerte aus beiden Techniken (Tab. 1; Spalte III) und auf der y-Achse die Differenzen (Tab. 1; Spalte IV) der Ergebnisse beider Messtechniken aufgetragen (Bland und Altman, 1986, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde der Mittelwert der aufgetragenen Differenzen mit einer gestrichelten Linie und die doppelte Standardabweichung mit gepunkteten Linien im Diagramm dargestellt. Wenn durch zwei Messtechniken die gleichen Werte erzielt wurden, war die Differenz der beiden Werte entsprechend Null (Tab. 1; schwarz markiert). Falls eine Messtechnik grundsätzlich kleinere Werte ergab, lagen die Daten unterhalb der Nulllinie (Tab. 1; lila, gelb und weiß markiert). Die Daten waren umso weiter von der Nulllinie entfernt, je schlechter die beiden Messtechniken miteinander korrelierten.

Zusätzlich wurden in einem weiteren Streudiagramm die prozentualen Abweichungen (Abb. 8C) zwischen den gemessenen Ultraschall-, Messschieber- und Histologievolumina verglichen. Zur Darstellung dieses Diagramms wurden auf der x-Achse die Ultraschallwerte (Tab. 1; Spalte I) aufgetragen. Die prozentuale Abweichung (in %) der zweiten Messmethode (Messschieber- oder Histologiedaten) zu den Ultraschalldaten wurde auf der y-Achse aufgetragen (Tab. 1; Spalte V). Der Mittelwert der y-Werte wurde als mittlere prozentuale Abweichung (MA) (Abb. 8C; rot gestrichelte Linie) definiert.

In einem weiteren Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde das Volumen der Endometrioseherde an Ultraschallbildern vergleichbar zu den Messschieber- und Histologiemessungen mit Hilfe der Ellipsoidformel bzw. der trapezoiden Interpolation berechnet. Auf diese Weise konnten die einzelnen Messtechniken unmittelbar miteinander verglichen werden.

3.7. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

In verschiedenen Versuchsgruppen wurde zusätzlich eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie am 3. Tag nach Induktion der Endometrioseherde durchgeführt, um die frühe Vaskularisierung der Herde analysieren zu können.

Dazu wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (75mg/kg KG; Pharmacia GmbH) und Xylazin (15mg/kg KG; Rompun; Bayer) narkotisiert. Anschließend erfolgte eine mediane Laparotomie und die Bauchwand wurde mit 2 sterilen Einmal-Kanülen (27G; BD Microlance 3, BD Droghead, Irland) seitlich auf eine Korkplatte aufgespannt. Auf diese Weise konnten die Endometrioseherde direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop positioniert werden. Zur Kontrastierung der Blutgefäße wurde den Versuchstieren der Fluoreszenzfarbstoff 5% Fluorescein-Isothiocyant (FITC)-Dextran (0,1ml/Tier; Molekulargewicht 150.000 Da, Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland) in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Auf Grund des hohen Molekulargewichts verbleibt dieser Fluoreszenzfarbstoff unter physiologischen Bedingungen intravasal und färbt so das Blutplasma an.

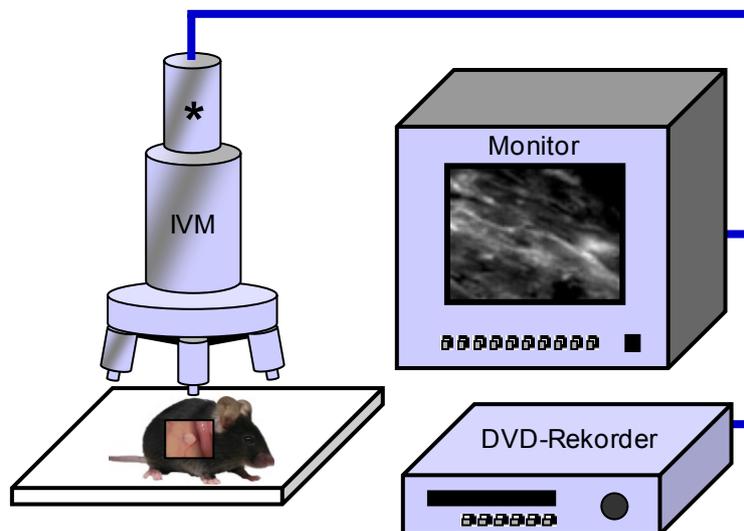


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes zur Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie. IVM, Intravitales Fluoreszenzmikroskop; Stern, CCD-Videokamera.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt. Die Auflichttechnik war mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe als Lichtquelle (HBO 100W OFR; Osram, Augsburg, Deutschland) ausgestattet. In das Strahlengangsystem war ein Filter für blaues Licht (Anregungswellenlänge: 450-490nm, Emissionswellenlänge: >520nm)

zur Darstellung der Mikrozirkulation nach FITC-Dextran-Injektion eingebaut. Die in vivo Aufnahmen wurden von einer hochempfindlichen CCD (charged coupled device)-Videokamera (FK 6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und über einen Bildschirm (PVM 1371-QM; Sony Corp., Tokio, Japan) an einen DVD-Rekorder (DVD R121; Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) übertragen (*Abb. 9*).

3.8. Konventionelle Histologie und Immunhistochemie

Für histomorphologische Untersuchungen wurden am Ende der jeweiligen Versuchsreihe die Endometrioseherde in 4%-iger Formaldehydlösung fixiert. Nach 48 Stunden erfolgte die Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schnittdicke von 5µm. Entsprechend histologischem Standardprotokoll wurde jeder zehnte Serienschnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Zusätzlich wurden immunhistochemische Analysen einzelner Schnitte durchgeführt. Die Myofibroblasten des Myometriums konnten aufgrund ihrer Expression von α -smooth-muscle actin (α -SMA) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers immunhistochemisch dargestellt werden. Hierzu wurden die entparaffinierten und dehydrierten Gewebeschnitte 7 Tage alter Endometrioseherde mit einem Kaninchen- α -SMA-Antikörper als Primärantikörper (1:100; Abcam, Cambridge, England) angefärbt. Direkt danach wurden die Objektträger mit dem korrespondierenden Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:100; Abcam) inkubiert, an den Peroxidase gekoppelt war. 3,3'-Diaminobenzidin wurde als Chromogen benutzt. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hemalaun zur Analyse der Schnitte im Lichtmikroskop (BX60; Olympus). Da die zu transplantierenden Uterusstanzen aus Endometrium (Schleimhautschicht), Myometrium (glatte Muskelschicht) und Perimetrium (Serosaschicht) bestanden, diente dies in einzelnen Gruppen zur Bestätigung der korrekten Fixierung des Perimetriums oder Endometriums an das Peritoneum der Bauchwand.

Eine aktivierte Caspase-3-Färbung erfolgte zur Darstellung apoptotischer Zellen in 28 Tage alten Endometrioseherden. Hierfür diente ein Kaninchen-anti-aktivierte-Caspase-3-Antikörper als Primärantikörper (1:100; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) und ein Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:100; Jackson, West Grove, PA, USA), der an Peroxidase gekoppelt war, als Sekundärantikörper. Zur Detektion

von proliferierenden Zellen wurden Endometrioseherde mit einem Antikörper gegen proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gefärbt. Hierzu wurde ein Maus-anti-PCNA-Antikörper als Primärantikörper verwendet (1:35; Dako, Hamburg, Deutschland). Als Sekundärantikörper diente ein Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:100; Jackson), der an Peroxidase gekoppelt war. 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid wurde sowohl bei der aktivierte Caspase-3- als auch bei der PCNA-Färbung als Chromogen verwendet. Nach Gegenfärbung mit 1% Methylgrün konnten die Schnitte lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Die aktivierte Caspase-3- und PCNA-positiven Zellen im Stroma wurden in 6 Herden der jeweiligen Gruppen ausgezählt und in % aller Zellen angegeben.

Zur Analyse der Blutgefäßdichte 7 Tage alter Endometrioseherde wurde zunächst eine Immunfärbung für CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule; PECAM-1) durchgeführt, wobei sich die Gefäßendothelien spezifisch anfärbten. Hierfür wurden die 5µm dicken, entparaffinierten und dehydrierten Gewebeschnitte mit einem Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper als Primärantikörper (1:30; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und einem Ziege-anti-Ratte-Cy3-Antikörper (1:50; Dianova GmbH) als Sekundärantikörper angefärbt. Jeder Schnitt wurde zusätzlich zur Darstellung der Zellkerne mit Hoechst (1:500; Sigma-Aldrich) gefärbt. Die Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte wurden unter einem BZ-8100 Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) zur quantitativen Auswertung der Mikrogefäßdichte (in mm⁻²) innerhalb der Endometrioseherde analysiert.

3.9. Experimentelles Protokoll

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei folgenden Studienabschnitte durchgeführt:

3.9.1. Evaluierung des hochauflösenden Ultraschallsystems Vevo770 zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell

In Studienabschnitt A wurden insgesamt 32 intraperitoneale Endometrioseherde in 8 Mäusen induziert (*Tab. 2; Gruppe 1A*). Hierzu wurden jeweils vier Uterusstanzen aus einem Spendertier an die Bauchwand eines Empfängertieres angenäht. Danach erfolgte die wöchentliche Ultraschalluntersuchung der Endometrioseherde. Am letzten Untersuchungstag wurden die Herde mit dem Messschieber vermessen und anschließend für weitere histologische Analysen entnommen. Die sonographisch

gemessenen Volumina der Endometrioseherde am Tag 28 wurden mit den mittels Messschieber bzw. Histologie ermittelten Volumina verglichen (*Kap. 3.6.*). Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Schnittabstände auf die Volumen-Analyse untersucht sowie die Intra- und Interobserver-Variabilität der 3D-Ultraschallmessung bestimmt (*Kap. 3.5.*).

3.9.2. Analyse verschiedener Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Endometrioseherden im intraperitonealen Modell

In Studienabschnitt B wurden zunächst 28 Tiere in vier Gruppen (jeweils $n = 7$) aufgeteilt, welche sich in der Art der Induktion der Endometrioseherde unterschieden. In einer ersten Gruppe (*Tab. 2; Gruppe 1B*) erfolgte die syngene Transplantation von 2mm-Uterusstanzen, wohingegen in einer zweiten Gruppe (*Tab. 2; Gruppe 2B*) eine autologe Transplantation der Stanzen durchgeführt wurde. In beiden Gruppen wurden die Stanzen so fixiert, dass das Endometrium in unmittelbarem Kontakt zum Peritoneum der Bauchwand stand. In einer dritten und vierten Gruppe (*Tab. 2; Gruppe 3B und 4B*) wurden 2mm- und 3mm-Uterusstanzen syngene transplantiert, wobei das Perimetrium der Stanzen an das Peritoneum der Bauchwand fixiert wurde. In jeder Gruppe wurden zwei Uterusstanzen pro Maus (linke und rechte Bauchwand) transplantiert. Die Tiere wurden direkt nach OP (Tag 0) sowie am 7., 14., 21. und 28. Tag sonographisch untersucht. Am Ende der in vivo Experimente wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert und die Endometrioseherde für weitere histologische Untersuchungen entnommen.

In einem zusätzlichen Experiment wurde die korrekte räumliche Orientierung und Vaskularisierung 7 Tage alter transplantierte Uterusstanzen analysiert. Hierzu erfolgte die syngene Transplantation von 12 Uterusstanzen mit einer Größe von 2mm in 6 Tiere, die entweder mit dem Endometrium (*Tab. 2; Gruppe 5B; $n = 3$*) oder dem Perimetrium (*Tab. 2; Gruppe 6B; $n = 3$*) an das Peritoneum der Bauchwand fixiert wurden. Nach 7 Tagen wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert und Gewebeschnitte der entnommenen Herde mit Antikörpern gegen α -SMA zur Bestätigung der korrekten räumlichen Orientierung und dem Gefäßmarker CD31 für die quantitative Analyse der Blutgefäßdichte immunhistochemisch gefärbt.

3.9.3. Etablierung eines subperitonealen Endometriosemodells

Studienabschnitt C der vorliegenden Arbeit umfasste zunächst drei Gruppen mit jeweils $n = 6$ Mäusen. Insgesamt wurden dabei 12 Endometrioseherde nach syngener Transplantation 2mm großer Uterusstanzen in einen subperitoneal gestochenen Tunnel induziert (*Tab. 2; Gruppe 1C*). Die sonographischen und histologischen Daten dieser Gruppe wurden mit denen der *Gruppe 1B (Kap. 3.9.2.)* verglichen.

Um den hormonellen Einfluss auf das Wachstumsverhalten subperitonealer Endometrioseherde zu untersuchen, wurden 6 Mäuse ovariectomiert. Nach einer zweiwöchigen Ruhephase erfolgte anschließend die Induktion subperitonealer Endometrioseherde (*Tab. 2; Gruppe 2C*). In der dritten Gruppe (*Tab. 2; Gruppe 3C*) wurde den Tieren nach der Induktion täglich 100mg/kg KG Danazol oral appliziert. Die Tiere wurden direkt nach OP (Tag 0) sowie am 7., 14., 21. und 28. Tag sonographisch untersucht. Am Ende der in vivo Experimente wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert und die Endometrioseherde für weitere histologische Untersuchungen entnommen.

In zusätzlichen Experimenten erfolgte die Analyse der frühen Vaskularisierung sich entwickelnder intra- oder subperitonealer Endometrioseherde. Hierzu wurden 6 Uterusstanzen mit einer Größe von 2mm in 3 Tiere subperitoneal transplantiert (*Tab. 2; Gruppe 4C; n = 3*). Nach 7 Tagen wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert und die entnommenen Herde mit dem Gefäßmarker CD31 zur quantitativen Analyse der Blutgefäßdichte immunhistochemisch angefärbt. Anschließend wurden diese Daten mit denen der Gruppe 5B (*Kap. 3.9.2.*) verglichen.

Des Weiteren erfolgte die Darstellung neuer Blutgefäße in drei Tage alten, intra- oder subperitonealen Endometrioseherden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Hierzu wurden 6 Uterusstanzen mit einer Größe von 2mm in 3 Tiere subperitoneal transplantiert (*Tab. 2, Gruppe 5C; n = 3*). Zur Kontrolle wurden ebenfalls 6 Uterusstanzen in 3 Tiere intraperitoneal transplantiert, wobei das Endometrium der Stanzen an das Peritoneum der Bauchwand fixiert wurde (*Tab. 2; Gruppe 6C; n = 3*). Am 3. Tag wurden die narkotisierten Tiere nach i.v.-Gabe des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran intravitalmikroskopisch bezüglich Vaskularisierung untersucht. Am Ende der in vivo Experimente wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert.

3. Material und Methoden

Tabelle 2: Überblick über die verschiedenen Versuchsgruppen der Studienabschnitte A (weiß), B (hellgrau) und C (dunkelgrau).

Gruppe	Anzahl der Mäuse	Anzahl der Transplantate je Tier	Modus der Transplantation	Peritoneum berührendes Gewebe / Lage	Uterus-stanzgröße	Versuchsdauer	Behandlung
1A	n = 8	4	syngen	----	2mm	28 Tage	----
1B	n = 7	2	syngen	Endometrium	2mm	28 Tage	----
2B	n = 7	2	autolog	Endometrium	2mm	28 Tage	----
3B	n = 7	2	syngen	Perimetrium	2mm	28 Tage	----
4B	n = 7	2	syngen	Perimetrium	3mm	28 Tage	----
5B	n = 3	2	syngen	Endometrium	2mm	7 Tage	----
6B	n = 3	2	syngen	Perimetrium	2mm	7 Tage	----
1C	n = 6	2	syngen	subperitoneal	2mm	28 Tage	----
2C	n = 6	2	syngen	subperitoneal	2mm	28 Tage	Ovarektomie
3C	n = 6	2	syngen	subperitoneal	2mm	28 Tage	Danazol
4C	n = 3	2	syngen	subperitoneal	2mm	7 Tage	----
5C	n = 3	2	syngen	subperitoneal	2mm	3 Tage	----
6C	n = 3	2	syngen	Endometrium	2mm	3 Tage	----

3.10. Statistik

Die elektronische Verarbeitung der Datensätze erfolgte unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2000 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels SigmaPlot 2004 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) als Balkendiagramme mit absoluten oder prozentualen Mittelwerten und dem Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM).

Zur statistischen Auswertung wurden die Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) unter Verwendung der SigmaStat Statistical Software (Version 2.03; Jandel Scientific, San Jose, CA, USA) geprüft.

Eine Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurde zum Test auf zeitliche Effekte während des Untersuchungszeitraums mittels einer One-Way Analysis of Variance (ANOVA) für wiederholte Messungen durchgeführt. Dieser folgte der entsprechende post hoc Test (parametrische Daten: Bonferroni; nicht-parametrische Daten: Tukey), der die Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen beinhaltet. Zum Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde ein Student's t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diesen nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test für unverbundene Stichproben (Mann Whitney-Test) durchgeführt.

Eine Two-Way ANOVA erfolgte zur Analyse des Zusammenhangs der zwei Hauptfaktoren „Lokalisation des Uterusgewebes“ (rechte versus linke Bauchwandseite innerhalb eines Tieres) und „Gruppencharakteristik“ (Transplantationsmodus, Ausrichtung der Uterusstanzen und Stanzgröße) auf das Wachstumsverhalten der chirurgisch induzierten Endometrioseherde. Ein post hoc Test nach Bonferroni wurde anschließend zur Untersuchung auf paarweise Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen durchgeführt. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurden Unterschiede in den Ergebnissen als signifikant angenommen.

Zusätzlich wurden Streudiagramme der Datensätze mit Berechnung eines Korrelationskoeffizienten nach Pearson und einer Bland-Altman-Analyse durchgeführt, um unterschiedliche Messtechniken miteinander vergleichen zu können.

4. Ergebnisse

4.1. Evaluierung des hochauflösenden Ultraschallsystems

Vevo770 zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell

4.1.1. Ultraschalluntersuchung von Endometrioseherden

Da in der vorliegenden Arbeit die Uterusstanzen an der lateralen Bauchwand fixiert wurden, konnte man die sich daraus entwickelnden Endometrioseherde mit dem Ultraschallgerät Vevo770 schnell auffinden. Weiterhin konnten durch diese Lokalisation Atmungsartefakte während der Bildgebung weitgehend vermieden werden. Somit war die repetitive, nicht-invasive Analyse wachsender Endometrioseherde mit Hilfe des hochauflösenden Ultraschallsystems leicht möglich (*Abb. 10*).

Unmittelbar nach der Transplantation stellten sich die Uterusstanzen als homogene Gewebemassen im Ultraschall dar, die dem Peritoneum der Bauchwand direkt anlagen (*Abb. 10A*). Während der folgenden Untersuchungszeitpunkte konnten echoarme, zystisch dilatierte Endometriosedrüsen (im folgenden als Zysten bezeichnet) innerhalb der Transplantate detektiert werden, was ein typisches Zeichen für die Entwicklung von Endometrioseherden ist (*Athey und Diment, 1989; Abb. 10B-E*).

Histologische Untersuchungen der Herde am Ende der in vivo-Experimente (Tag 28) bestätigten die Ultraschallergebnisse. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die transplantierten Uterusstanzen zu typischen Endometrioseherden entwickelt. Diese wiesen zystisch dilatierte endometriale Drüsen auf, welche von einem gut vaskularisierten endometrialen Stroma umgeben waren (*Abb. 10F*).

Die Lokalisation und Ausdehnung dieser Zysten konnte auch in dreidimensionalen Ultraschallrekonstruktionen unter Verwendung der Software von VisualSonics dargestellt werden (*Abb. 11A und B*). Weiterhin war es mit Hilfe der hochauflösenden Ultraschallbildgebung erstmalig möglich, nicht-invasiv Verwachsungen um die Endometrioseherde zu detektieren (*Abb. 11C und D*).

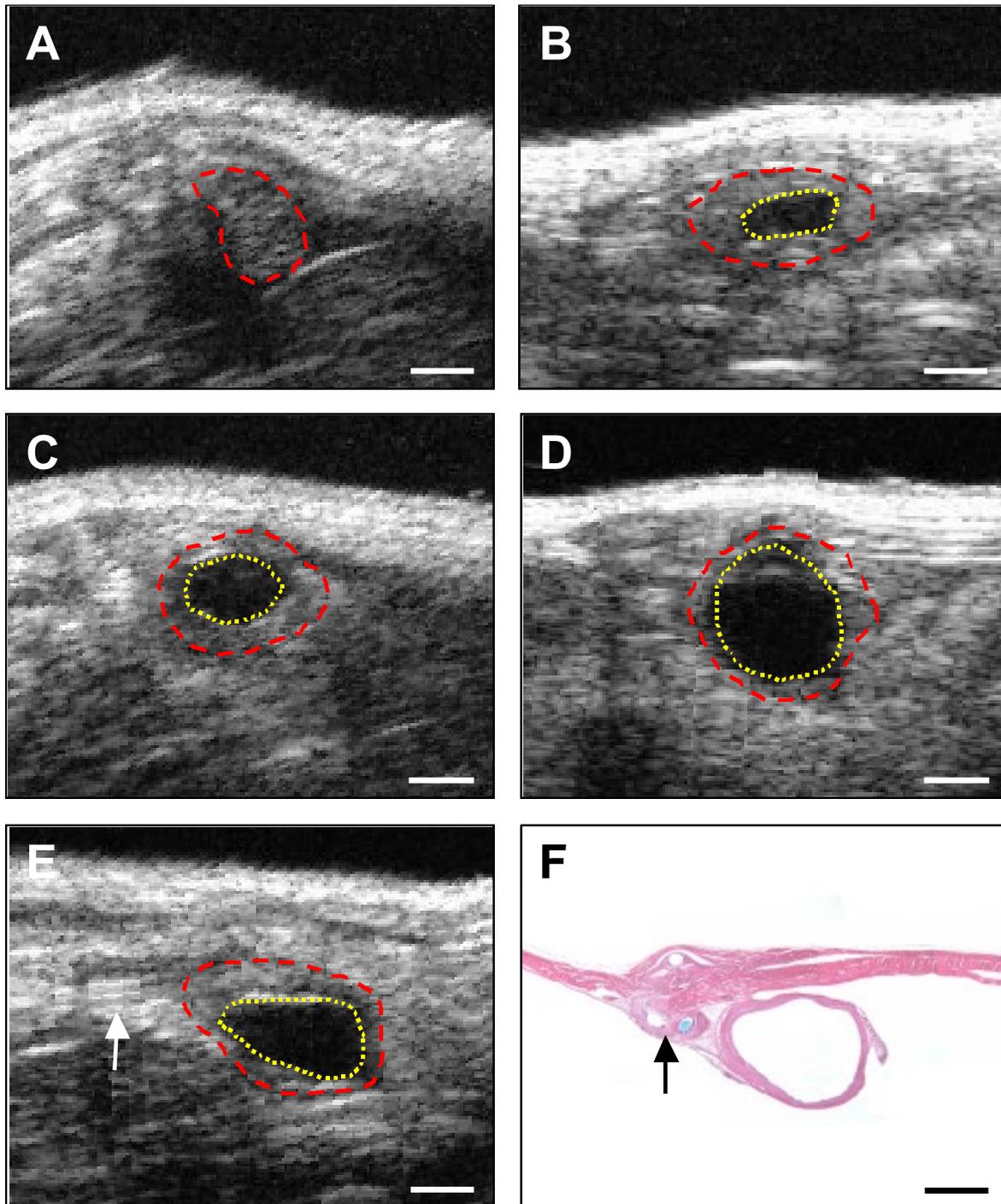


Abbildung 10: A-E: Hochauflösende Ultraschallbilder eines sich entwickelnden Endometrioseherdes (Herdgrenze durch rot gestrichelte Linie markiert) sofort (A) sowie 7 (B), 14 (C), 21 (D) und 28 Tage (E) nach der Fixierung einer Uterusstanze an die laterale Bauchwand. Die Ausbildung von echoarmen Zysten (B-E, Grenze durch gelb gepunktete Linie markiert) kann mit dieser nicht-invasiven Technik leicht verfolgt werden. E und F: Vergleich eines Ultraschallbildes (E) mit dem dazugehörigen HE-gefärbten histologischen Präparat (F). Die Histologie zeigt die typische Histomorphologie eines Endometrioseherdes, der aus einer zystisch dilatierten Drüse besteht, welche von einem gut durchbluteten Stroma umgeben ist (F). Durch die Fixierung der Uterusstanze mit einem Prolenefaden entsteht ein Granulom im Randbereich des Herdes (E und F, Pfeil), welches sich im Ultraschall aufgrund der unterschiedlichen Echogenität sehr gut von dem eigentlichen Endometrioseherd abgrenzen lässt. Skalierung: 600 μ m.

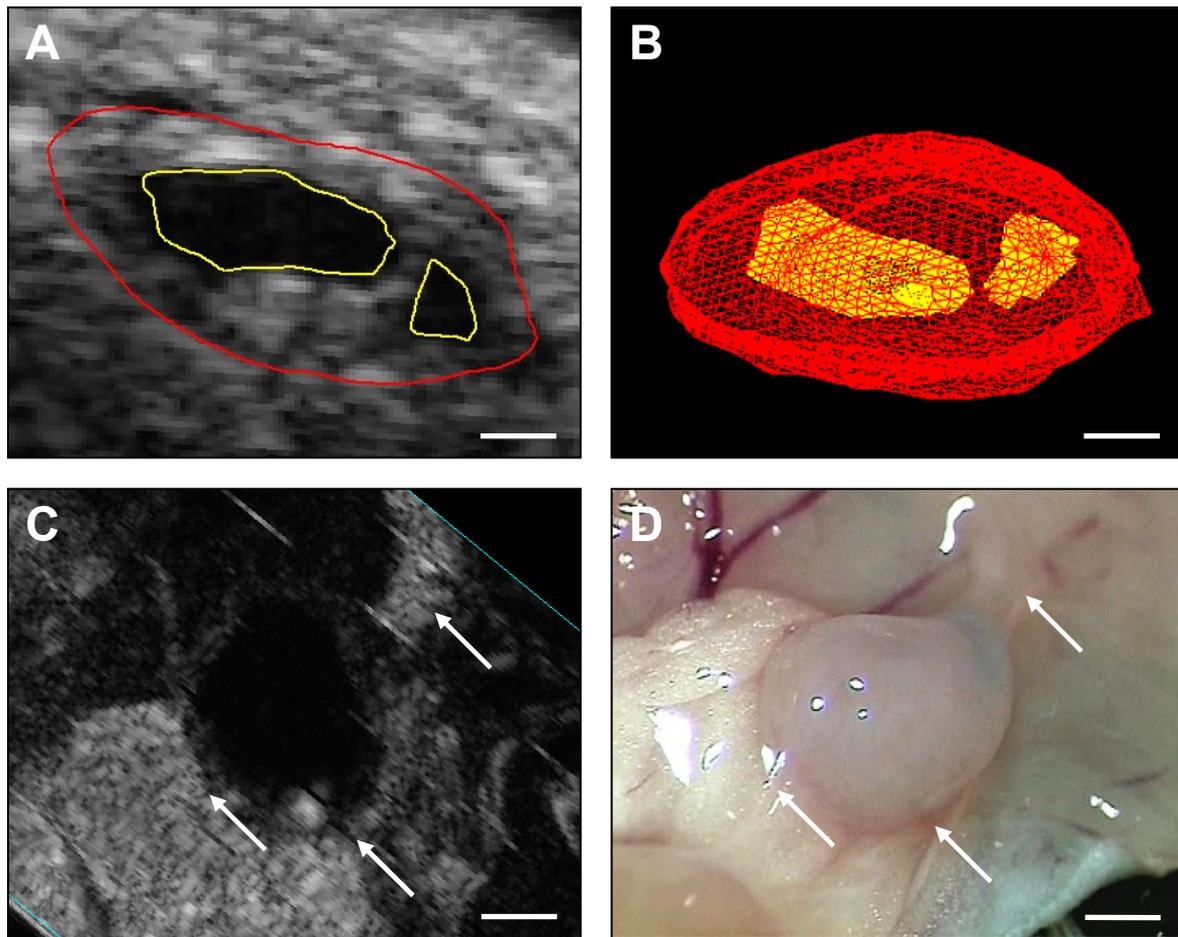


Abbildung 11: **A, B:** Dreidimensionale Rekonstruktion eines Endometrioseherdes (**B**, rotes Polygon) mit zwei Zysten (**B**, gelbe Polygone) basierend auf zweidimensionalen Ultraschallbildern (**A**). **C, D:** Hochauflösendes Ultraschallbild von Verwachsungen (**C**, Pfeile) um einen Endometrioseherd und die entsprechende Aufnahme der Verwachsungen unter einem Stereomikroskop (**D**, Pfeile) nach Laparotomie des Tieres. Skalierung: **A, B** = 240 μ m; **C, D** = 600 μ m.

Quantitative Analysen der Ultraschallaufnahmen zeigten ein deutliches Wachstum der Endometrioseherde über den vierwöchigen Untersuchungszeitraum, so dass am Tag 28 die Herdvolumina mit $\sim 2,0\text{mm}^3$ im Vergleich zu $0,9\text{mm}^3$ am Tag 0 signifikant erhöht waren (*Abb. 12A*). Allerdings zeigten detaillierte Analysen der Stroma- und Zystenvolumina einzelner Herde, dass das Stroma lediglich während der ersten sieben Tage nach der Transplantation der Uterusstanzen proliferierte (*Abb. 12B und C*). Im weiteren Verlauf wurde die Volumenzunahme der Herde hauptsächlich durch eine Zunahme des Zystenvolumens verursacht.

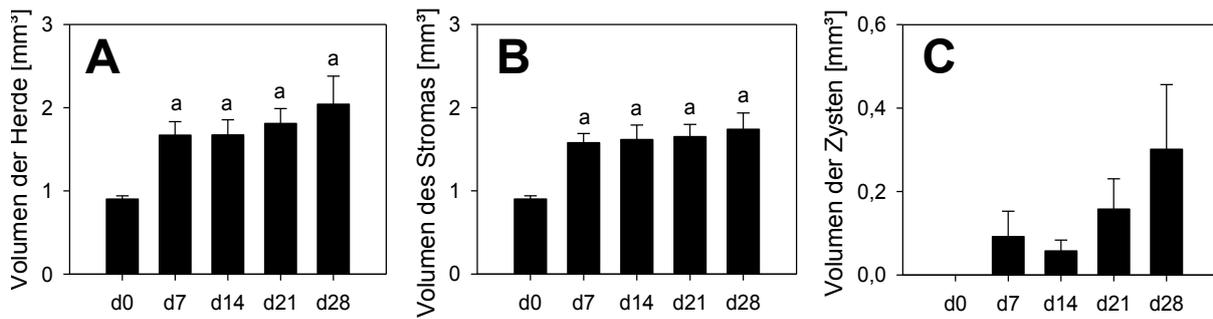


Abbildung 12: Gesamtvolumen der Endometrioseherde (A), ihres Stromas (B) und ihrer Zysten (C) (in mm³; n = 8 Mäuse). Durch manuelles Abmessen der Herde und ihrer Zysten in zweidimensionalen Ultraschallbildern kann anschließend computergestützt ein dreidimensionales Volumen berechnet werden. Mittelwert ± SEM; ^aP < 0,05 versus Tag 0.

4.1.2. Einfluss des Schnittabstandes auf die ultraschallbasierte Volumenmessung

Zur dreidimensionalen Ultraschallrekonstruktion und Volumenmessung von Endometrioseherden werden zunächst Schnittabstände festgelegt, in denen zweidimensionale Aufnahmen der Herde durchgeführt und vermessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser Schnittabstände auf die gemessenen Volumina einzelner Herde untersucht.

Der Vergleich der Volumenmessungen mit einem Schnittabstand von 50µm mit denjenigen mit größeren Schnittabständen von 100µm, 200µm, 400µm und 500µm zeigte eine gute Korrelation der Ergebnisse (Abb. 13A, C, E und G). Die mittlere prozentuale Abweichung der Volumenmessungen mit einem Schnittabstand von 100µm bzw. 500µm lag jedoch bei -0,48% bzw. -13,33% im Vergleich zur Volumenmessung mit einem Schnittabstand von 50µm (Abb. 13B, D, F und H). Folglich wurde das Volumen der Endometrioseherde unter Verwendung höherer Schnittabstände bei der dreidimensionalen Volumenberechnung unterschätzt. Detaillierte Betrachtungen des Verteilungsmusters der Volumina von Endometrioseherden, die mit verschiedenen Schnittabständen ausgemessen wurden, zeigten, dass diese Abweichung am ehesten bei kleinen Herden mit einem Volumen <1mm³ auftrat.

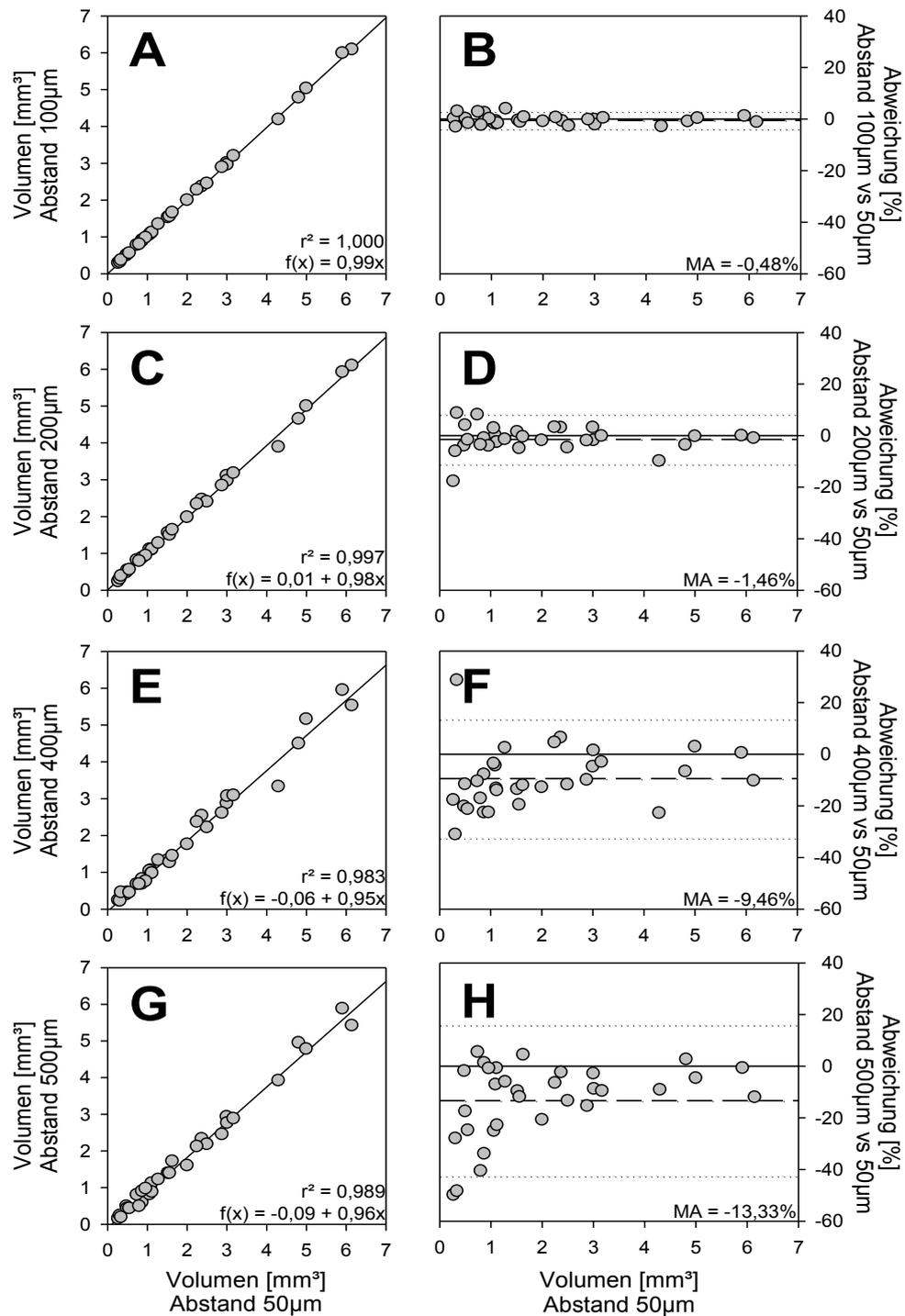


Abbildung 13: Vergleich der ultraschallbasierten Volumenmessungen von Endometrioseherden ($n = 32$) in Abhängigkeit der verwendeten Schnittabstände. Die Berechnung der Volumina erfolgte nach dem manuellen Messen zweidimensionaler Ultraschallbilder mit unterschiedlichen Schnittabständen ($50\mu\text{m}$ - $500\mu\text{m}$). Verglichen wurde jeweils mit dem Volumen, das mit einem Schnittabstand von $50\mu\text{m}$ bestimmt wurde. **A, C, E, G:** Streudiagramm mit Regressionsgerade ($f(x) = ax + b$) und dem dazugehörigen Korrelationskoeffizienten (r^2). **B, D, F, H:** Streudiagramm mit der prozentualen Abweichung zwischen den Messungen der beiden zu vergleichenden Schnittabstände. Im Diagramm ist der Mittelwert der prozentualen Abweichung (MA; gestrichelte Linie) sowie die doppelte Standardabweichung (gepunktete Linien) eingezeichnet. Die durchgezogene Linie markiert die Null-Linie des Diagramms.

4.1.3. Intra- und Interobserver-Variabilität

Der lineare Korrelationskoeffizient von zwei Volumenmessungen identischer Endometrioseherde durch einen Untersucher (Intraobserver-Variabilität) betrug $r^2 = 0,977$ (Abb. 14A). Die mittlere prozentuale Abweichung der individuellen Messungen lag bei 1,46% (Abb. 14B).

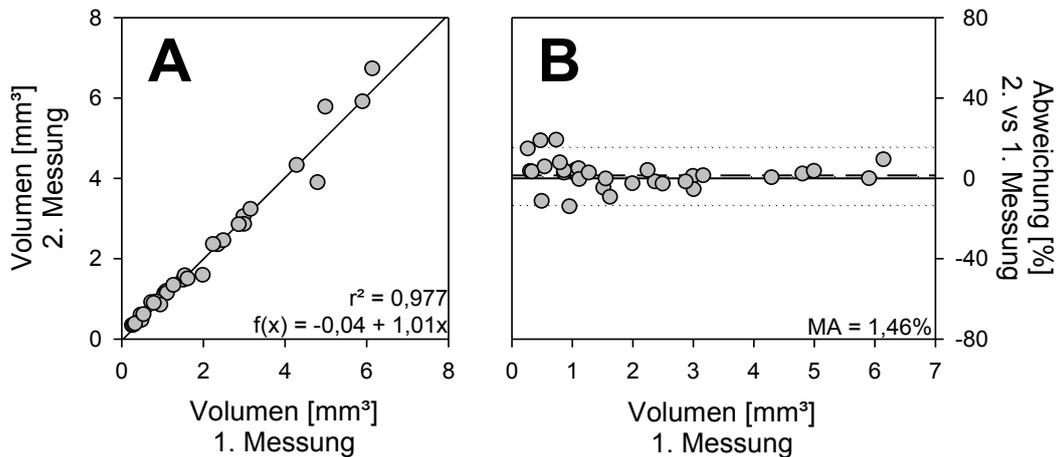


Abbildung 14: Vergleich der ultraschallbasierten Volumenmessungen von Endometrioseherden ($n = 32$) zur Bestimmung der Intraobserver-Variabilität. **A:** Streudiagramm mit Regressionsgerade und dazugehörigem Korrelationskoeffizienten. **B:** Streudiagramm der prozentualen Abweichung der nacheinander folgenden Messungen eines Untersuchers. In den Diagrammen ist der Mittelwert der prozentualen Abweichung (MA; gestrichelte Linie) sowie die doppelte Standardabweichung (gepunktete Linien) eingezeichnet. Die durchgezogene Linie markiert die Null-Linie des Diagramms.

Zusätzlich zeigten Untersuchungen zur Interobserver-Variabilität hohe Korrelationen der Volumenmessungen dreier unabhängiger Untersucher mit $r^2 = 0,970$ (erster versus zweiter Untersucher; Abb. 15A), $r^2 = 0,958$ (erster versus dritter Untersucher; Abb. 15C) und $r^2 = 0,955$ (zweiter versus dritter Untersucher; Abb. 15E). In den Streudiagrammen der prozentualen Abweichung zeigte sich bei den verschiedenen Messungen keine Tendenz zur Über- oder Unterschätzung der Volumina einzelner Herde (Abb. 15B, D und F). Die größten Messabweichungen wurden in kleinen Endometrioseherden mit einem Volumen $<1,5\text{mm}^3$ gefunden.

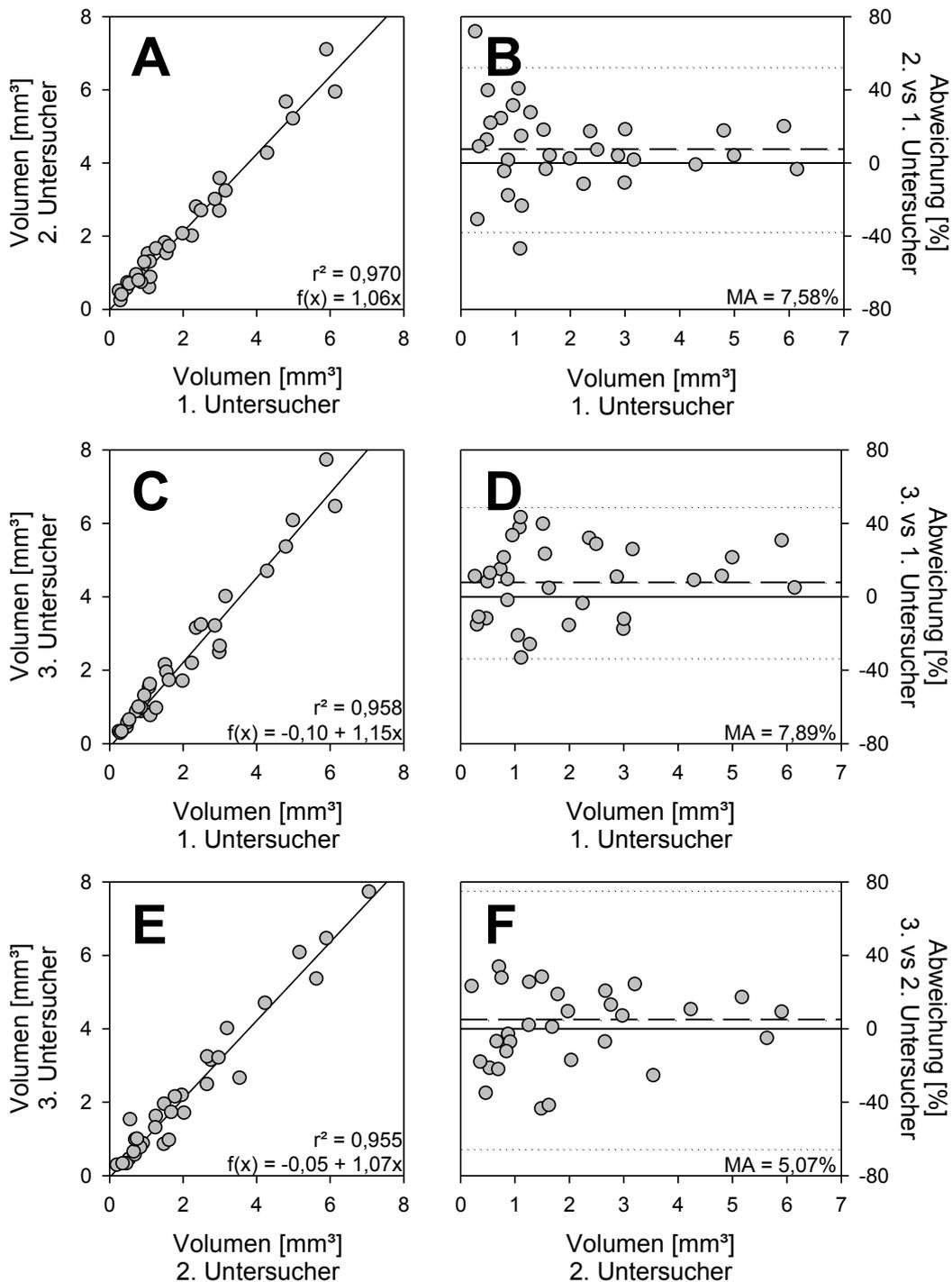


Abbildung 15: Vergleich der ultraschallbasierten Volumenmessungen von Endometrioseherden ($n = 32$) zur Bestimmung der Interobserver-Variabilität. **A, C, E:** Streudiagramm mit Regressionsgerade und dazugehörigem Korrelationskoeffizienten. **B, D, F:** Streudiagramm der prozentualen Abweichung der Messungen unterschiedlicher Untersucher. In den Diagrammen ist der Mittelwert der prozentualen Abweichung (MA; gestrichelte Linie) sowie die doppelte Standardabweichung (gepunktete Linien) eingezeichnet. Die durchgezogene Linie markiert die Null-Linie des Diagramms.

4.1.4. Korrelation der Volumenmessungen mittels Ultraschall, Messschieber und Histologie

Der Vergleich zwischen ultraschallbasierten, dreidimensionalen Volumenmessungen einzelner Endometrioseherde und Volumenmessungen mittels Messschieber ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,874$ (*Abb. 16A*), was eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden anzeigt. Es gab keine Anzeichen, dass die messschieberbasierten Volumina der Endometrioseherde im Vergleich zu den ultraschallbasierten Volumina unter- bzw. überschätzt wurden. Weiterhin lagen fast alle Werte innerhalb der zweifachen Standardabweichung des Bland-Altman-Diagramms (*Abb. 16E*). Für einzelne Herde wurden jedoch große prozentuale Abweichungen der mit den beiden unterschiedlichen Messverfahren bestimmten Volumina von bis zu 87% gefunden (*Abb. 16I*).

Beim Vergleich der ultraschallbasierten Volumenmessungen mit den histologischen Messungen betrug der Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,939$ (*Abb. 16B*). Dabei wurden die Volumina, die mittels Histologie gemessen wurden, im Vergleich zu den ultraschallbasierten Volumina grundsätzlich unterschätzt. Weiterhin zeigte die Bland-Altman-Analyse, dass die Differenz zwischen Histologie- und Ultraschallvolumen arithmetisch mit der Größenzunahme der Endometrioseherde anstieg (*Abb. 16F*). Die prozentualen Abweichungen einzelner Herde waren eng um die mittlere prozentuale Abweichung von -68,91% verteilt (*Abb. 16J*; gestrichelte Linie).

Um die verschiedenen Messmethoden direkt miteinander vergleichen zu können, wurden in einem weiteren Abschnitt die Volumina der Endometrioseherde aus den Ultraschallbildern entsprechend der Messschieber- und Histologieformeln berechnet und aufgetragen (*Abb. 16C, D, G, H, K und L*). Ein Vergleich der Abbildungen 16A-D, E-H und I-L zeigt, dass sich keine nennenswerte Unterschiede zwischen den einzelnen Datensätzen aufgrund der unterschiedlichen Messmethoden ergaben.

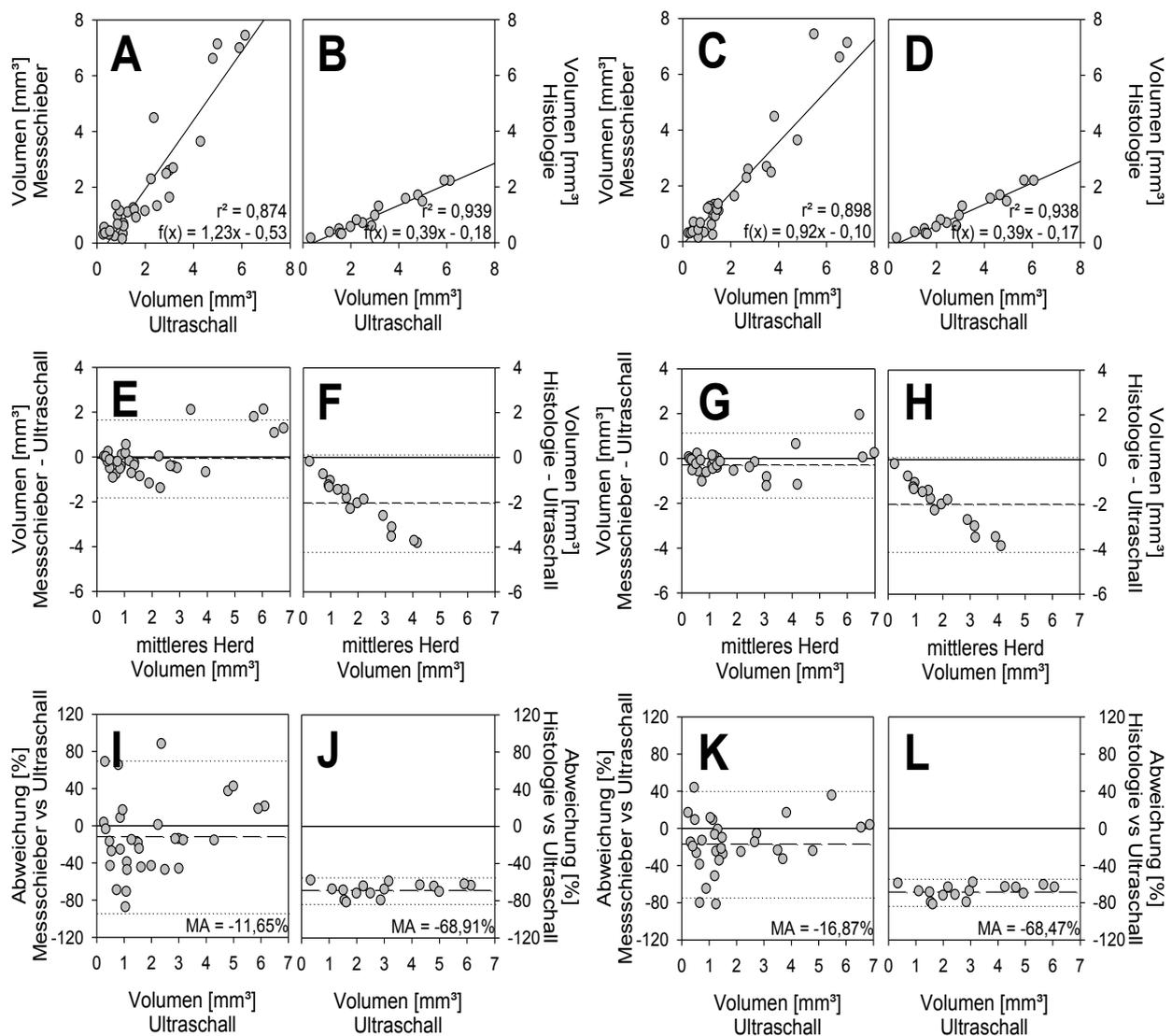


Abbildung 16: Vergleich der Volumenmessungen von Endometrioseherden, die mit verschiedenen Messtechniken durchgeführt wurden. Ultraschallbasierte Messungen wurden mit Messungen basierend auf Messschieber (A, E, I; $n = 32$) und Histologie (B, F, J; $n = 16$) verglichen. A-B: Streudiagramm mit Regressionsgerade und dem dazugehörigen Korrelationskoeffizienten. E-F: Bland-Altman-Diagramm mit dem Mittelwert der Differenzen der einzelnen Messtechniken (gestrichelte Linie) und der doppelten Standardabweichung (gepunktete Linien). I-J: Streudiagramm mit prozentualer Abweichung zwischen den jeweiligen Messmethoden. In den Diagrammen ist der Mittelwert der prozentualen Abweichung (MA; gestrichelte Linie) sowie die doppelte Standardabweichung (gepunktete Linien) eingezeichnet. Die durchgezogene Linie markiert die Null-Linie des Diagramms. In C, D, G, H, K und L wurden entsprechende Analysen durchgeführt. Allerdings wurden hierbei die Herdvolumina aus den Ultraschallbildern entsprechend der Ellipsoidformel (C, G und K) bzw. der trapezoiden Interpolation (D, H und L) der Messschieber- und Histologie-Analysen errechnet.

4.2. Analyse verschiedener Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Endometrioseherden im intraperitonealen Modell

4.2.1. Einfluss der Lokalisation von Uterusstanzen in der Bauchhöhle

In diesem Studienabschnitt wurde zunächst der Einfluss der Lokalisation von fixierten Uterusstanzen in der Bauchhöhle auf das Wachstumsverhalten der sich daraus entwickelnden Endometrioseherde analysiert. Hierzu erfolgte die Fixierung von jeweils einer Uterusstanze an die linke und die rechte Bauchwand eines Tieres. Dann wurden die Herdvolumina der rechten und linken Seite mit einer Two-Way ANOVA verglichen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Endometrioseherde nicht von der Lokalisation der transplantierten Uterusstanzen abhängig war (Daten nicht dargestellt).

4.2.2. Syngene versus autologe Transplantation von Uterusstanzen

In einer weiteren Versuchsreihe dieses Studienabschnitts wurden Endometrioseherde durch die syngene oder autologe Transplantation von isolierten Uterusstanzen in die Bauchhöhle induziert. Die Uterusstanzen entwickelten sich zu Endometrioseherden mit typischen sonographischen Merkmalen, wie echoarmen Zysten, unabhängig davon, ob sie syngen oder autolog in die Bauchhöhle transplantiert wurden (*Abb. 17A und B*). Die quantitative Analyse der Ultraschallbilder zeigte, dass die Herde beider Gruppen zu Beginn des Versuchs ein vergleichbares Volumen von $\sim 1,0\text{mm}^3$ aufwiesen. Während des folgenden Untersuchungszeitraums von 28 Tagen kam es in beiden Gruppen zu einer Volumenzunahme der Herde (*Abb. 17C und D*). Diese Volumenzunahme wurde einerseits durch die Proliferation des Stromagewebes (*Abb. 17E und F*) und andererseits durch die Entwicklung von Zysten innerhalb der Herde (*Abb. 17G und H*) verursacht. Interessanterweise wiesen die Zysten im autologen Modell größere Volumina zwischen dem 7. und 28. Tag im Vergleich zu den Zysten im syngenem Modell auf. Allerdings zeigte die Messung der Zystenvolumina eine große Variabilität (*Abb. 17G*). Der Anteil zystenenthaltender Herde war in beiden Gruppen vergleichbar (*Abb. 17H*).

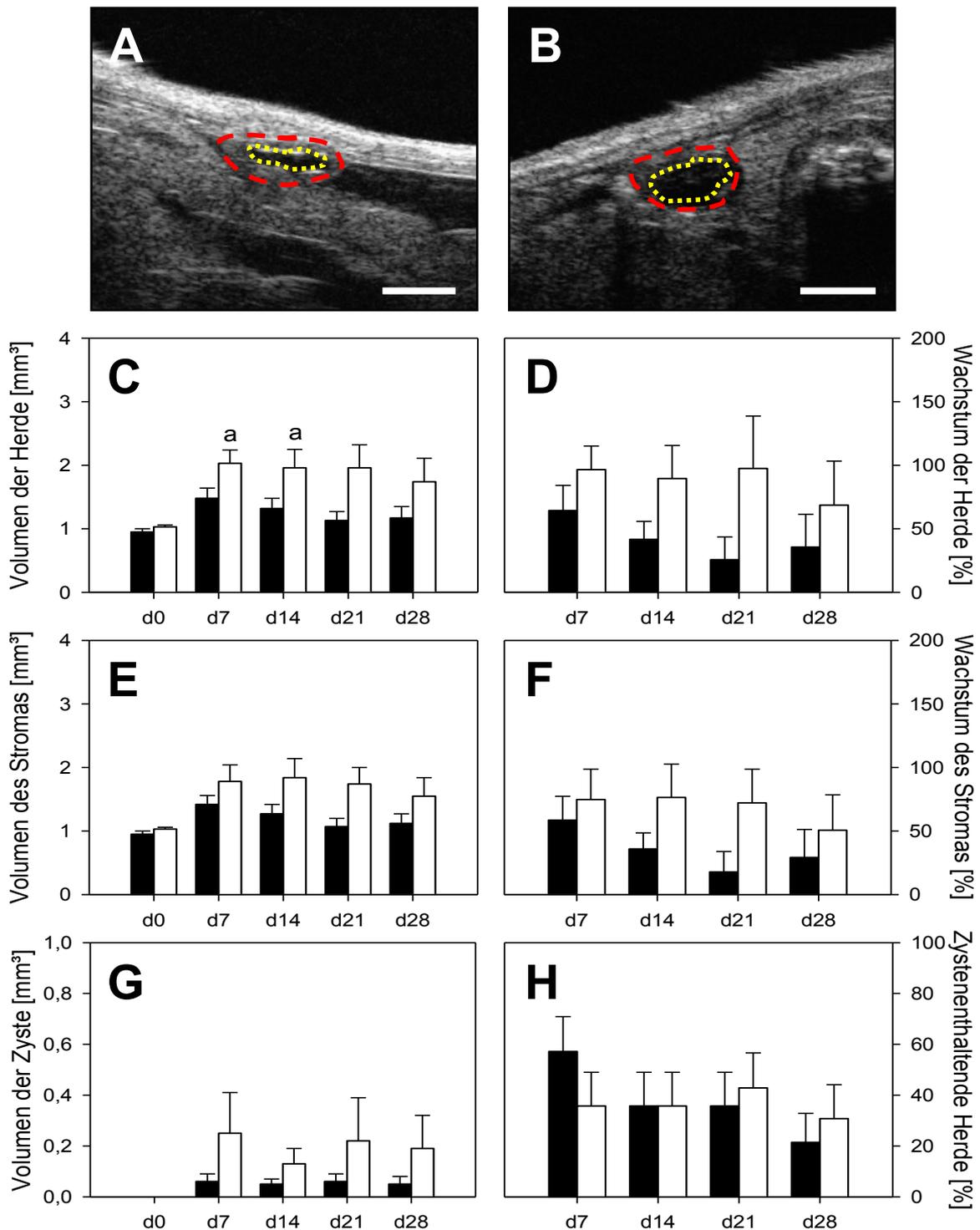


Abbildung 17: A-B: Hochauflösende Ultraschallbilder wachsender Endometrioseherde (Herdgrenze mit roter Linie markiert; Zystengrenze mit gelber Linie markiert) 28 Tage nach syngener (A) und autologer (B) Transplantation von 2mm-Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen ($n = 7$). C-H: Gesamtvolumen der Herde (C, in mm³), Herdwachstum (D, in %), Volumen des Stromagewebes (E, in mm³), Stromawachstum (F, in %), Zystenvolumen (G, in mm³) und Anteil zystenenthaltender Herde (H, in %). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch syngene (schwarze Balken) oder autologe (weiße Balken) Transplantation von 2mm-Uterusstanzen an die Bauchwand induziert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte die Untersuchung mit dem hochauflösenden Ultraschallgerät Vevo770. Skalierung: A, B = 860 μ m. Mittelwert \pm SEM; ^a $P < 0,05$ versus Tag 0.

4.2.3. Einfluss der räumlichen Orientierung von Uterusstanzen

Uterusgewebe, welches mit einer Biopsiestanze aus einem Uterushorn entnommen wird, enthält nicht nur Endometrium sondern auch Myometrium und Perimetrium. In einem weiteren Versuchsansatz wurden daher Uterusstanzen entweder mit dem Endometrium oder dem Perimetrium an die Bauchwand angenäht (*Abb. 18A und B*), um zu analysieren, ob die initiale räumliche Orientierung der Transplantate einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der sich daraus entwickelnden Endometrioseherde hat.

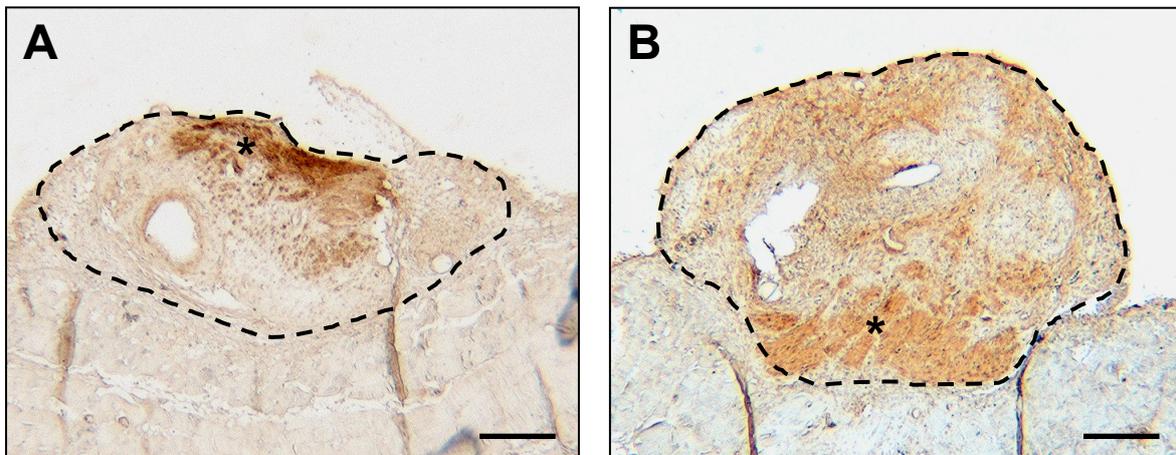


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von Uterusstanzen (Grenze mit schwarz gestrichelter Linie markiert) mit einem α -SMA-Antikörper 7 Tage nach Fixierung an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium (**A**) oder das Perimetrium (**B**) in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht. Anschließend konnte durch die Position des angefärbten Myometriums (**Stern**) die korrekte räumliche Orientierung der Uterusstanze bestätigt werden. Skalierung: 250 μ m.

Interessanterweise wiesen die Stanzen, bei denen das Perimetrium mit dem darunterliegenden Myometrium direkten Kontakt zum Peritoneum der Bauchwand hatten, eine signifikante Volumenzunahme sowie ein signifikant gesteigertes Herdwachstum über den Untersuchungszeitraum auf (*Abb. 19A-D*). Detailliertere Ultraschallanalysen des Stomachgewebes und der Zystenvolumina zeigten, dass diese Zunahme hauptsächlich durch ein Wachstum des Stromas zwischen dem 7. und 28. Tag verursacht wurde (*Abb. 19E und F*), wohingegen die Zystenvolumina und der Anteil zystenhaltender Herde keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufwiesen (*Abb. 19G und H*).

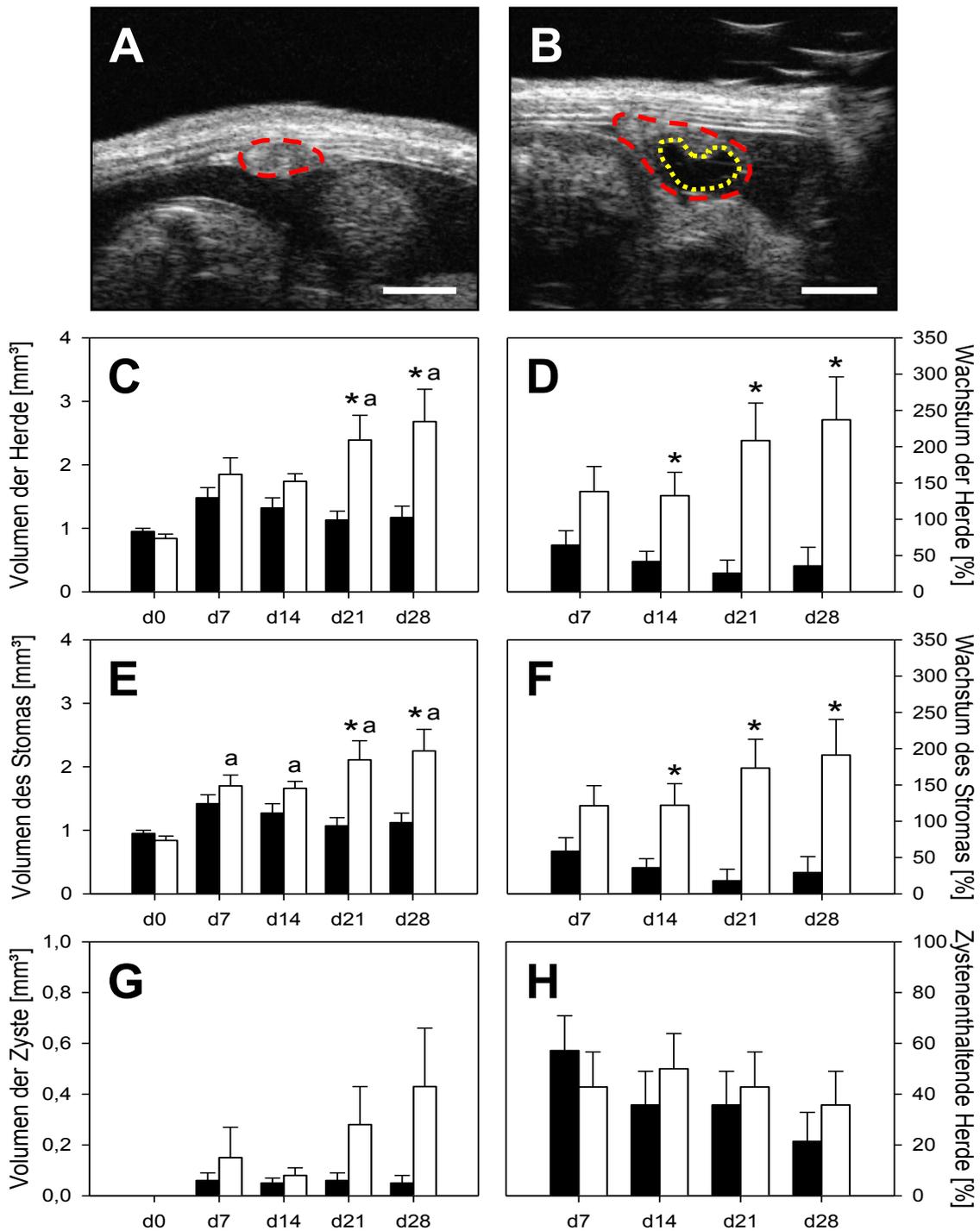


Abbildung 19: A-B: Hochauflösende Ultraschallbilder wachsender Endometrioseherde (Herdgrenze mit roter Linie markiert; Zystengrenze mit gelber Linie markiert) 28 Tage nach Fixierung von Uterusstanzen an das Peritoneum von C57BL/6-Mäusen mit entweder dem Endometrium (A) oder dem Perimetrium (B) in direktem Kontakt zum Peritoneum der Bauchwand (n = 7). C-H: Gesamtvolumen der Herde (C, in mm³), Herdwachstum (D, in %), Volumen des Stromagewebes (E, in mm³), Stromawachstum (F, in %), Zystenvolumen (G, in mm³) und Anteil zystenenthaltender Herde (H, in %). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch die Fixierung von Uterusstanzen an die Bauchwand induziert. Hierbei wurde entweder das Endometrium (schwarze Balken) oder das Perimetrium (weiße Balken) in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte die Untersuchung mittels des hochauflösenden Ultraschallgeräts Vevo770. Skalierung: A, B = 860µm. Mittelwert ± SEM; *P < 0,05 versus Endometrium in direktem Kontakt zum Peritoneum, ^aP < 0,05 versus Tag 0.

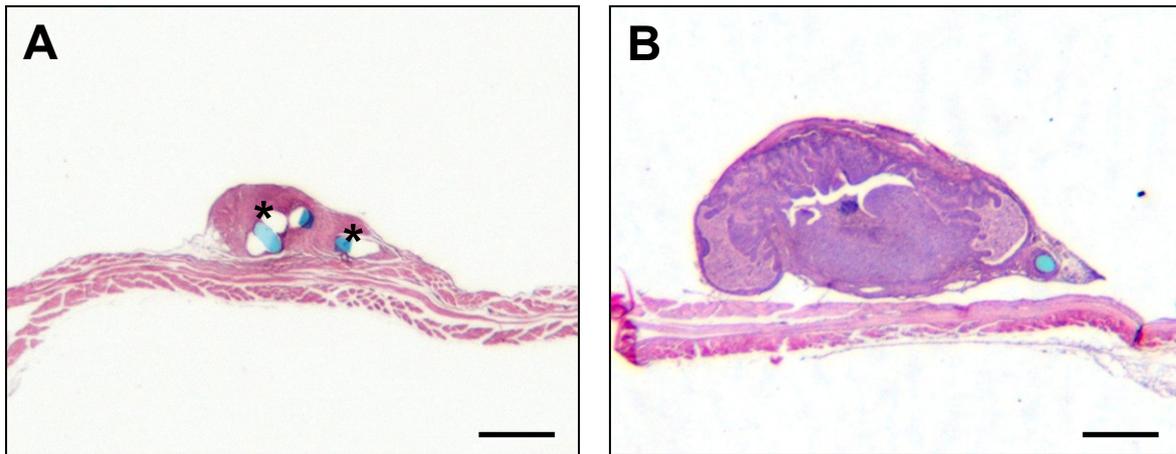


Abbildung 20: Histologische Schnitte von Endometrioseherden am Tag 28 (HE-Färbung). Die Induktion der Herde erfolgte chirurgisch durch Fixierung von Uterusstanzen an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium (A) oder das Perimetrium (B) in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht. Die **Sterne** in A markieren einen gewebebefreien Bereich, in dem der Prolenefaden ursprünglich verlief. Das Fadenmaterial wurde jedoch teilweise während der Prozessierung des Schnitts herausgelöst. Skalierung: 460µm.

Histologische Untersuchungen der Endometrioseherde am 28. Tag bestätigten die Ergebnisse der Ultraschallanalysen. Die Uterusstanzen, welche mit dem Perimetrium zur Bauchwand angenäht wurden, entwickelten sich zu größeren Endometrioseherden mit endometrialen Drüsen und einer deutlichen Zunahme des Stromagewebes im Vergleich zu den Herden, welche mit dem Endometrium in direktem Kontakt zur Bauchwand fixiert wurden (Abb. 20A und B).

Die immunhistochemische Detektion der aktivierten Caspase-3 zeigte, dass dieser Unterschied nicht durch unterschiedliche Apoptoseraten in den Herden der beiden Gruppen verursacht war. Tatsächlich konnten keine aktivierten Caspase-3-positiven Zellen im Stroma der beiden Gruppen gefunden werden (Abb. 21A und B). Im Gegensatz dazu wiesen Gewebeproben, bei denen das Perimetrium an die Bauchwand fixiert wurde, im Vergleich zu Gewebeproben, bei denen das Endometrium an die Bauchwand angenäht wurde, einen signifikant gesteigerten Anteil PCNA-positiver Zellen von $10,0 \pm 1,2\%$ versus $1,6 \pm 0,4\%$ auf (Abb. 21C und D).

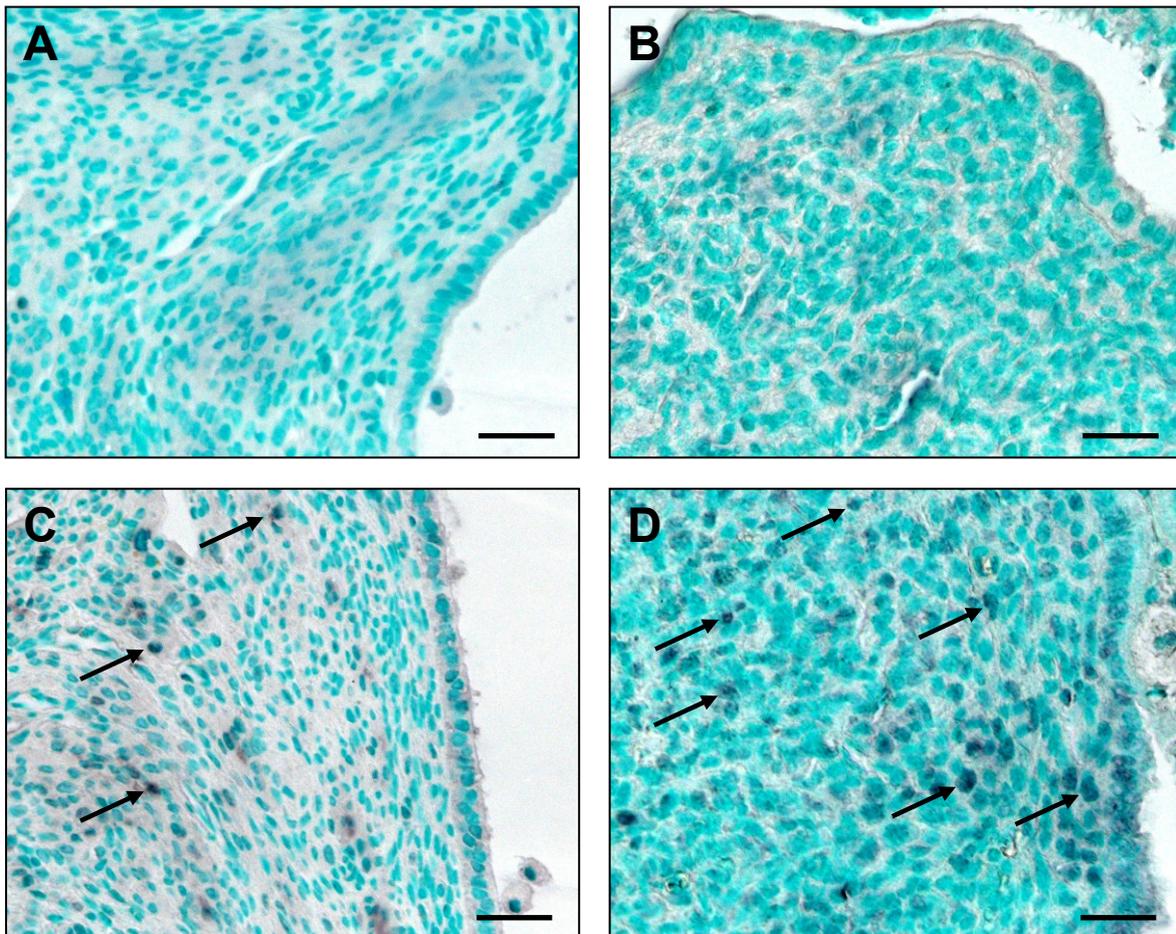


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung von Endometrioseherden am Tag 28. Die Induktion der Herde erfolgte chirurgisch durch Fixierung von Uterusstanzen an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium (A und C) oder das Perimetrium (B und D) in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht. A-B: Mittels immunhistochemischer Färbung für aktivierte Caspase-3 konnten in keiner der beiden Gruppen apoptotische Zellen nachgewiesen werden. C-D: Endometrioseherde, bei denen das Perimetrium an das Peritoneum der Bauchwand angenäht wurde (D), wiesen im Vergleich zu Herden, bei denen das Endometrium an das Peritoneum der Bauchwand angenäht wurde (C), eine gesteigerte Anzahl PCNA-positiver Stroma- und Drüsenzellen (Pfeile) auf. Skalierung: 30 μ m.

Weiterhin zeigten die immunhistochemischen Analysen unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen CD31 sieben Tage alter Endometrioseherde, welche mit dem Perimetrium an die Bauchwand fixiert wurden, im Vergleich zu den Herden, welche mit dem Endometrium an die Bauchwand fixiert wurden, eine signifikant erhöhte Gefäßdichte von $226 \pm 18\text{mm}^{-2}$ versus $162 \pm 6\text{mm}^{-2}$ (Abb. 22A und B).

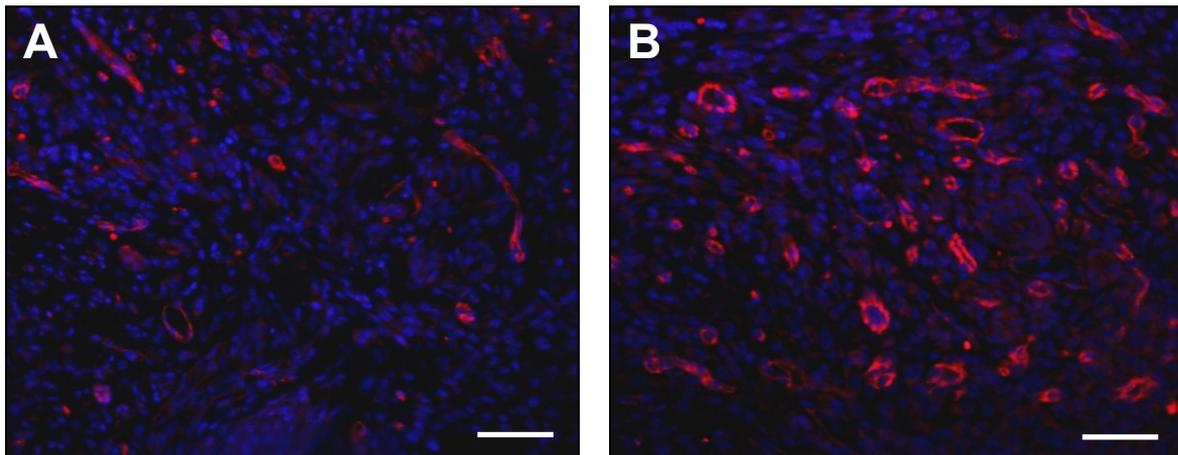


Abbildung 22: Darstellung von Gefäßendothelien mittels immunhistochemischer CD31-Färbung in Endometrioseherden am Tag 7. Die Induktion der Herde erfolgte chirurgisch durch Fixierung von Uterusstanzen an die Bauchwand von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium (**A**) oder das Perimetrium (**B**) in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht. Die Schnitte wurden mit Hoechst zur Identifizierung der Zellkerne (**blau**) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung des Gefäßendothels (**rot**) angefärbt. Es ist deutlich erkennbar, dass Endometrioseherde, bei denen das Perimetrium an das Peritoneum der Bauchwand angenäht wurde (**B**), im Vergleich zu Herden, bei denen das Endometrium an das Peritoneum der Bauchwand angenäht wurde (**A**), eine gesteigerte Anzahl CD31-positiver Endothelzellen aufweisen. Skalierung: 60µm.

4.2.4. Einfluss der Größe transplanteder Uterusstanzen

In diesem Versuchsabschnitt wurden Endometrioseherde verglichen, die mit Uterusstanzen einer Größe von 2mm oder 3mm induziert wurden. Die Herde, die sich aus den 3mm großen Uterusstanzen entwickelten, zeigten im Vergleich zu den Herden, die sich aus den 2mm großen Uterusstanzen entwickelten, über den gesamten Untersuchungszeitraum von 28 Tagen ein signifikant höheres Gesamtvolumen sowie ein signifikant höheres Volumen des Stromaanteils (*Abb. 23A, B, C und E*). Weiterhin konnte in dieser Gruppe am Tag 28 ein deutlich höherer Anteil von zystenenthaltenden Endometrioseherden beobachtet werden (*Abb. 23G*). Das Zystenvolumen der Herde, die sich aus 3mm-Uterusstanzen entwickelten, zeigte auch eine signifikante Größenzunahme im Vergleich zu Tag 7 (*Abb. 23H*). Jedoch war das prozentuale Wachstum der Herde und deren Stroma, die sich aus 3mm-Uterusstanzen ausbildeten, im Vergleich zu den Herden, die sich aus den 2mm-Uterusstanzen entwickelten, wesentlich geringer (*Abb. 23D und F*).

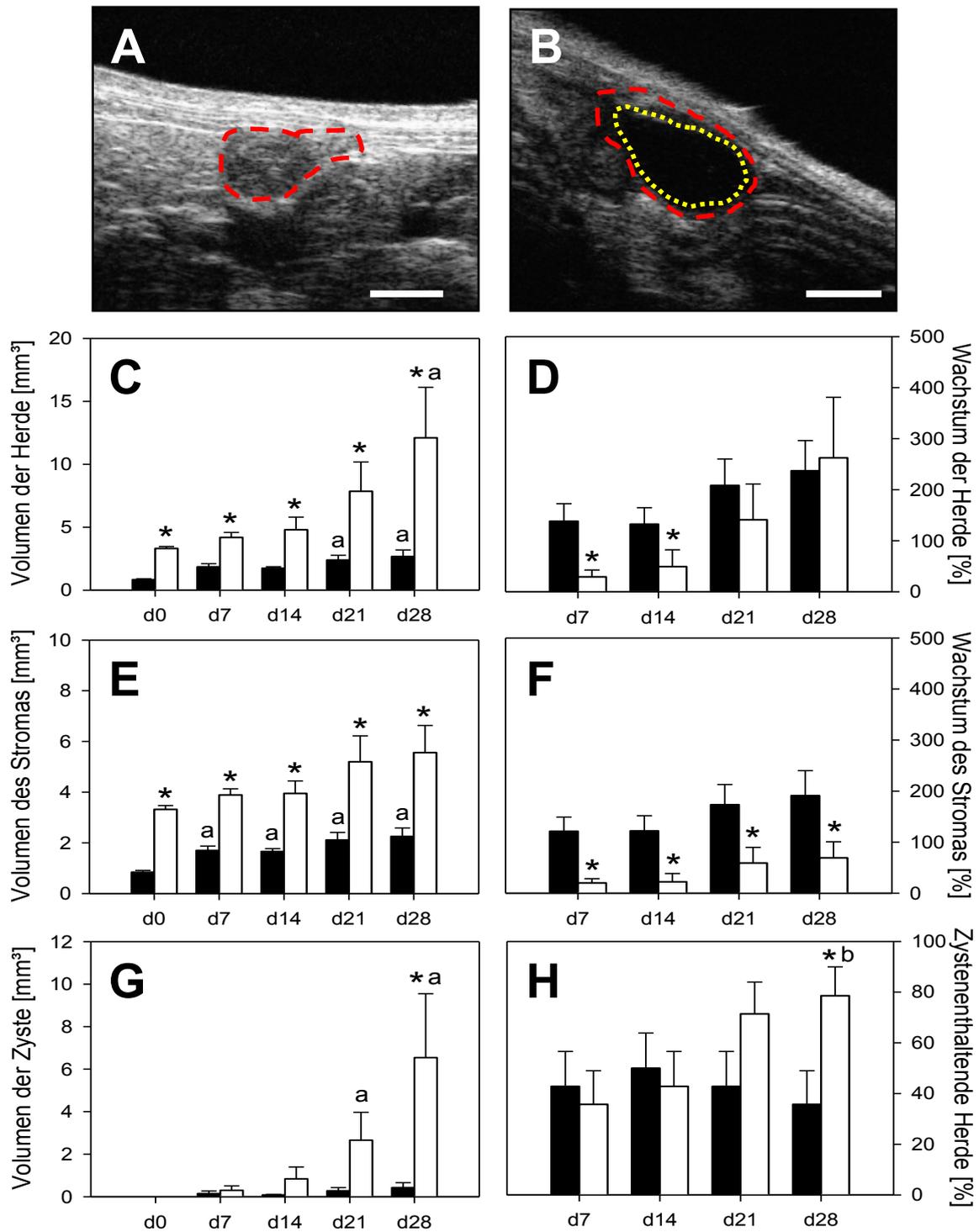


Abbildung 23: Hochauflösende Ultraschallbilder wachsender Endometrioseherde (Herdgrenze mit roter Linie markiert; Zystengrenze mit gelber Linie markiert) 28 Tage nach Transplantation von 2mm- (A) und 3mm- (B) Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen (n = 7). C-H: Gesamtvolumen der Herde (C, in mm³), Herdwachstum (D, in %), Volumen des Stromagewebes (E, in mm³), Stromawachstum (F, in %), Zystenvolumen (G, in mm³) und Anteil zystenenthaltender Herde (H, in %). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch Transplantation von 2mm- (schwarze Balken) oder 3mm- (weiße Balken) Uterusstanzen in die Bauchhöhle induziert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte die Untersuchung mittels des hochauflösenden Ultraschallgeräts Vevo770. Skalierung: A, B = 860µm. Mittelwert ± SEM; *P < 0,05 versus 2mm-Uterusstanzen; ^aP < 0,05 versus Tag 0; ^bP < 0,05 versus Tag 7.

4.3. Etablierung eines subperitonealen Endometriosemodells

4.3.1. Vergleich des intraperitonealen Endometriosemodells mit dem subperitonealen Endometriosemodell

In diesem Versuchsabschnitt wurden Endometrioseherde verglichen, die entweder durch die intraperitoneale oder subperitoneale Transplantation von 2mm-Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen induziert wurden. Ultraschallaufnahmen der Uterusstanzen direkt nach der Transplantation zeigten homogene Gewebemassen, die in beiden Gruppen ein vergleichbares Gesamtvolumen aufwiesen (*Abb. 24A, C und E*).

Die subperitonealen Uterusstanzen entwickelten sich zu Endometrioseherden, die ab dem 21. Tag im Vergleich zu den intraperitonealen Herden ein signifikant erhöhtes Volumen und eine signifikant erhöhte Wachstumsrate aufwiesen (*Abb. 24B, D-F*). Dies war einerseits durch das Wachstum des Stromas (*Abb. 24G und H*) und andererseits durch eine Volumenzunahme der Zysten auf bis zu $2,24 \pm 0,21\text{mm}^3$ an Tag 21 (*Abb. 24I*) bedingt. Weiterhin zeigten die Ultraschallaufnahmen ab dem 14. Tag in 100% der subperitonealen Endometrioseherde echoarme Zysten (*Abb. 24J*). Zusätzlich konnte mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie bereits am 3. Tag in den subperitonealen Herden eine beginnende Vaskularisierung nachgewiesen werden. Dies war in intraperitonealen Herden nicht der Fall (*Abb. 25A und B*).

Histologische Untersuchungen der Endometrioseherde am 28. Tag bestätigten die Ergebnisse der Ultraschallanalysen. Die Uterusstanzen, welche subperitoneal transplantiert wurden, entwickelten sich zu großen Endometrioseherden mit deutlich dilatierten und stark verzweigten Endometriosedrüsen sowie einer signifikanten Zunahme des Stromagewebes im Vergleich zu den intraperitonealen Herden, bei denen das Endometrium an die Bauchwand fixiert wurde (*Abb. 26A und B*).

Die Auswertung immunhistochemischer Schnitte zeigte, dass keine aktivierten Caspase-3-positiven apoptotischen Zellen im Stroma der Endometrioseherde beider Gruppen lokalisiert waren (*Abb. 27A und B*). Die Schnitte der subperitoneal induzierten Endometrioseherde wiesen jedoch im Vergleich zu den intraperitonealen Herden einen signifikant höheren Anteil PCNA-positiver Zellen von $8,2 \pm 0,9\%$ versus $1,6 \pm 0,4\%$ auf (*Abb. 27C und D*).

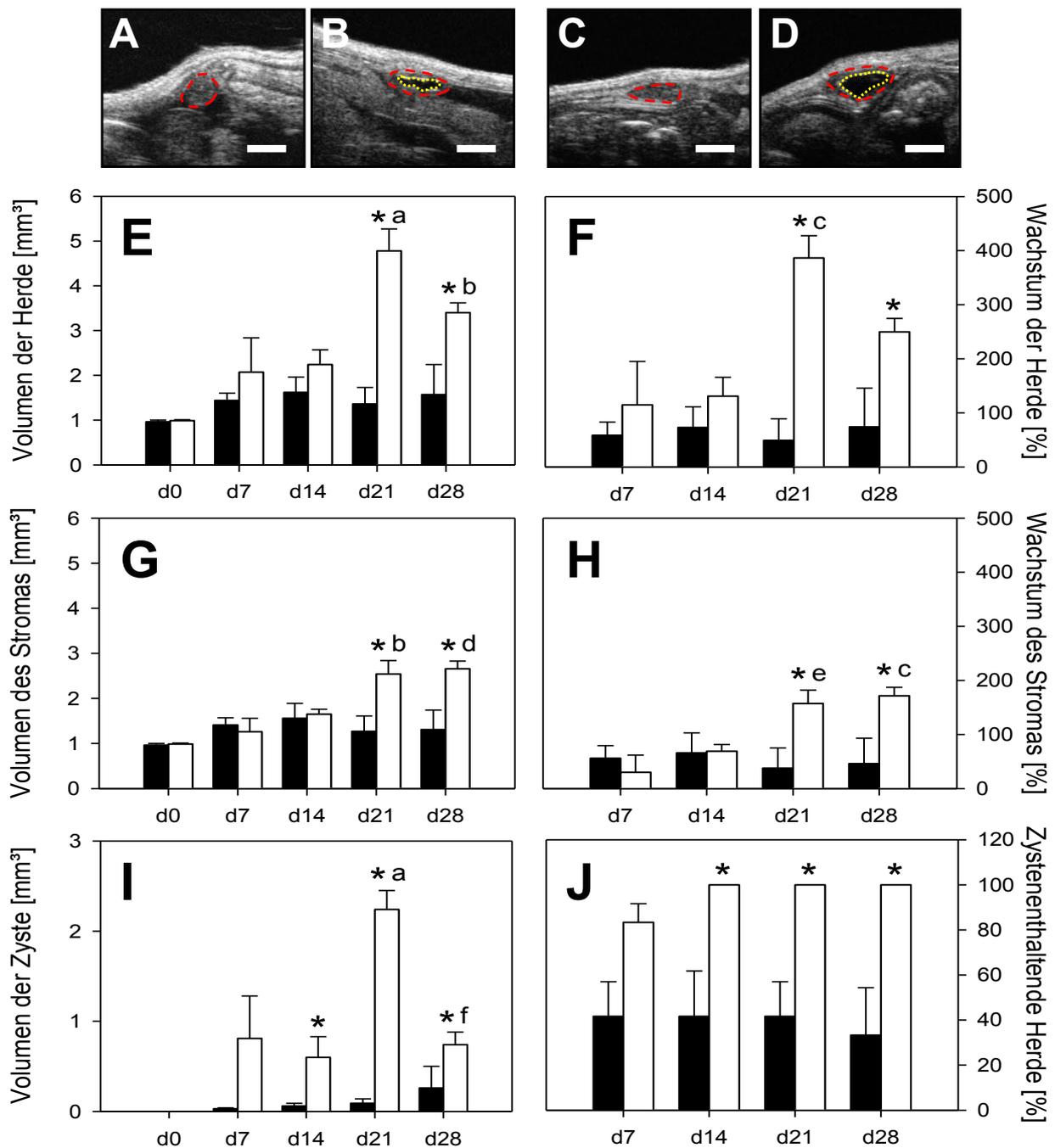


Abbildung 24: Hochauflösende Ultraschallbilder intraperitonealer (A-B) und subperitonealer (C-D) Endometrioseherde nach Transplantation von Uterusstanzen (Herdgrenze mit roter Linie markiert; Zystengrenze mit gelber Linie markiert) in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen an Tag 0 (A und C) sowie Tag 28 (B und D) ($n = 6$). E-J: Gesamtvolumen der Herde (E, in mm³), Herdwachstum (F, in %), Volumen des Stromagewebes (G, in mm³), Stromawachstum (H, in %), Zystenvolumen (I, in mm³) und Anteil zystenenthaltender Herde (J, in %). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch intraperitoneale (schwarze Balken) oder subperitoneale (weiße Balken) Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle induziert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte die Untersuchung mittels des hochauflösenden Ultraschallgeräts Vevo770. Skalierung: A-D = 1,5mm. Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$ versus intraperitoneale Herde; ^a $P < 0,05$ versus Tag 0, 7 und 14; ^b $P < 0,05$ versus Tag 0; ^c $P < 0,05$ versus Tag 7 und 14; ^d $P < 0,05$ versus Tag 0 und 7; ^e $P < 0,05$ versus Tag 7; ^f $P < 0,05$ versus Tag 21.

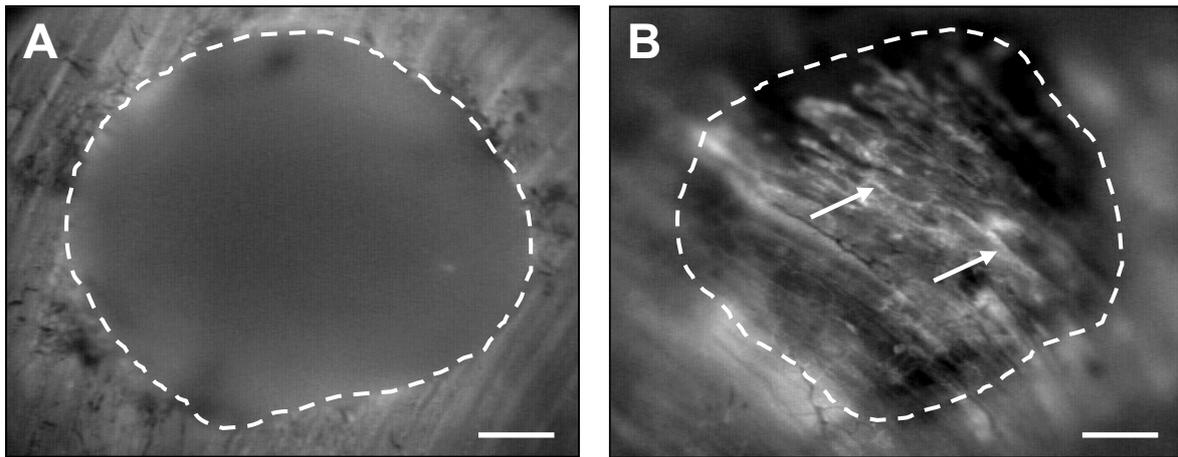


Abbildung 25: Intravitaler Fluoreszenzmikroskopie von Endometrioseherden am 3. Tag zur Darstellung FITC-Dextran-markierter, perfundierter Gefäße (**Pfeile**). Die Induktion der Herde (Herdgrenze durch weiß gestrichelte Linie markiert) erfolgte chirurgisch durch Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium der Uterusstanze in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht (**A**) oder die Uterusstanze subperitoneal eingeschoben (**B**). Es ist deutlich erkennbar, dass in den subperitonealen Herd bereits am 3. Tag perfundierte Blutgefäße enthalten sind. Skalierung: 340µm.

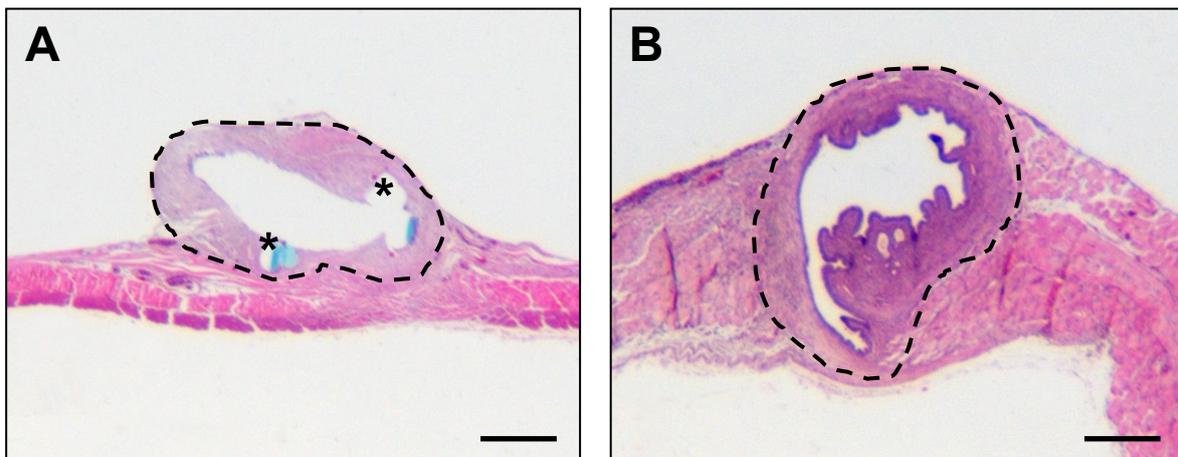


Abbildung 26: Histologische Schnitte von Endometrioseherden (Herdgrenze durch schwarz gestrichelte Linie markiert) an Tag 28 (HE-Färbung). Die Induktion der Herde erfolgte chirurgisch durch Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium der Uterusstanze in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht (**A**) oder die Uterusstanze subperitoneal eingeschoben (**B**). Die **Sterne** in (**A**) markieren einen gewebefreien Bereich, in dem der Prolenefaden ursprünglich verlief. Das Fadenmaterial wurde jedoch teilweise während des Prozessierungsvorgangs der Schnitte herausgelöst. Skalierung: 640µm.

Weiterhin wurde eine signifikant erhöhte Dichte CD31-positiver Endothelzellen von $231 \pm 17\text{mm}^{-2}$ versus $162 \pm 6\text{mm}^{-2}$ in den subperitonealen Endometrioseherden im Vergleich zu den intraperitonealen Herden gefunden (*Abb. 28A und B*).

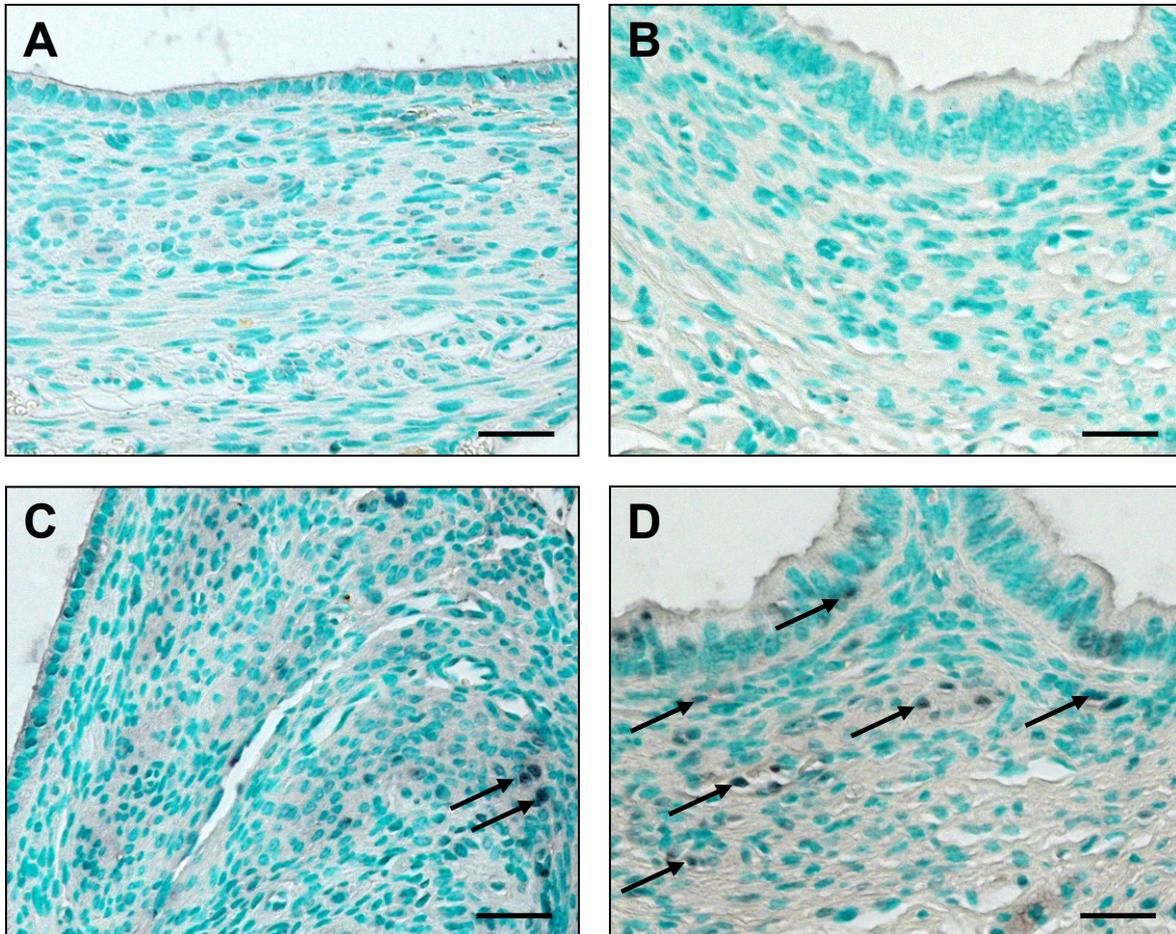


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von Endometrioseherden am Tag 28. Die Induktion der Herde erfolgte chirurgisch durch Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium der Uterusstanzen in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht (**A** und **C**) oder die Uterusstanzen subperitoneal eingeschoben (**B** und **D**). **A-B:** In beiden Gruppen sind keine aktivierten Caspase-3-positiven Zellen nachweisbar. **C-D:** Endometrioseherde, die subperitoneal eingeschoben wurden (**D**), weisen eine gesteigerte Anzahl PCNA-positiver Stroma- und Drüsenzellen im Vergleich zu den intraperitonealen Herden auf (**Pfeile**). Skalierung: $30\mu\text{m}$.

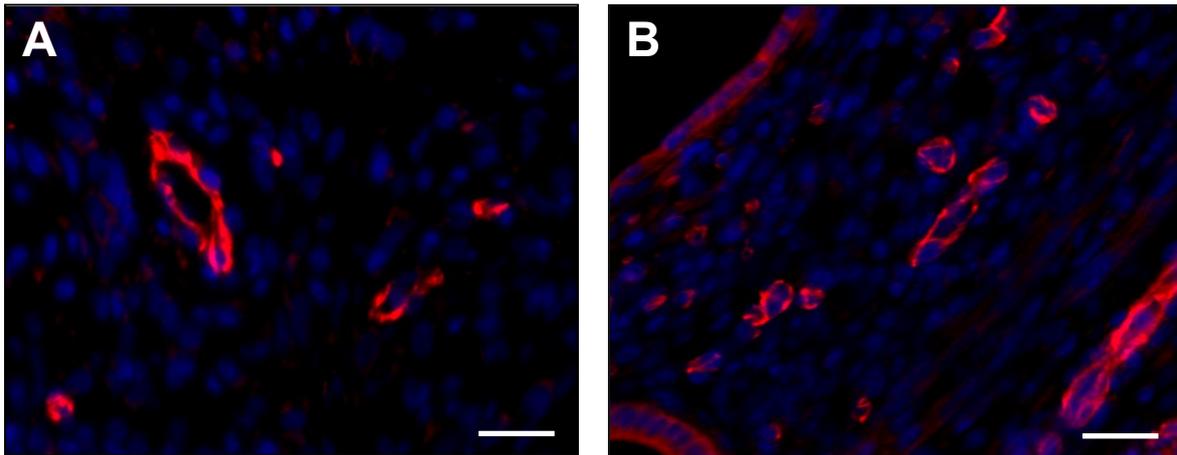


Abbildung 28: Darstellung von Gefäßendothelien mittels immunhistochemischer CD31-Färbung in Endometrioseherden am Tag 7. Die Induktion der Herde erfolgte chirurgisch durch Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen. Hierbei wurde entweder das Endometrium der Uterusstanzen in direktem Kontakt zum Peritoneum angenäht (**A**) oder die Uterusstanzen subperitoneal eingeschoben (**B**). Die Schnitte wurden mit Hoechst zur Identifizierung der Zellkerne (**blau**) und einem Antikörper gegen CD31 zur Darstellung des Gefäßendothels (**rot**) angefärbt. Endometrioseherde, die subperitoneal eingeschoben wurden (**B**), wiesen eine gesteigerte Anzahl CD31-positiver Gefäßendothelzellen im Vergleich zu den intraperitonealen Herden auf. Skalierung: 30µm.

4.3.2. Inhibition der endogenen Hormonausschüttung im subperitonealen Endometriosemodell

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der hormonelle Einfluss auf das Wachstum subperitonealer Endometrioseherde untersucht. Hierzu wurde in einer Versuchsgruppe eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt, um auf diese Weise wesentlich die endogene Östradiol-Ausschüttung zu unterbinden. Nach einer zweiwöchigen Erholungszeit erfolgte die Induktion subperitonealer Endometrioseherde. Die Herde der ovariectomierten Tiere zeigten über den Untersuchungszeitraum von vier Wochen eine deutliche Volumenabnahme im Vergleich zu den Herden der unbehandelten Tiere (*Abb. 29A-F*).

Die histologischen Untersuchungen am Ende der in vivo-Versuche (Tag 28) bestätigten im Wesentlichen die Ergebnisse der Ultraschallaufnahmen (*Abb. 30A und B*). Die meisten dieser kleinen Zysten konnten allerdings im Ultraschallbild aufgrund ihrer geringen Größe nicht mehr detektiert werden (*Abb. 29G und H*).

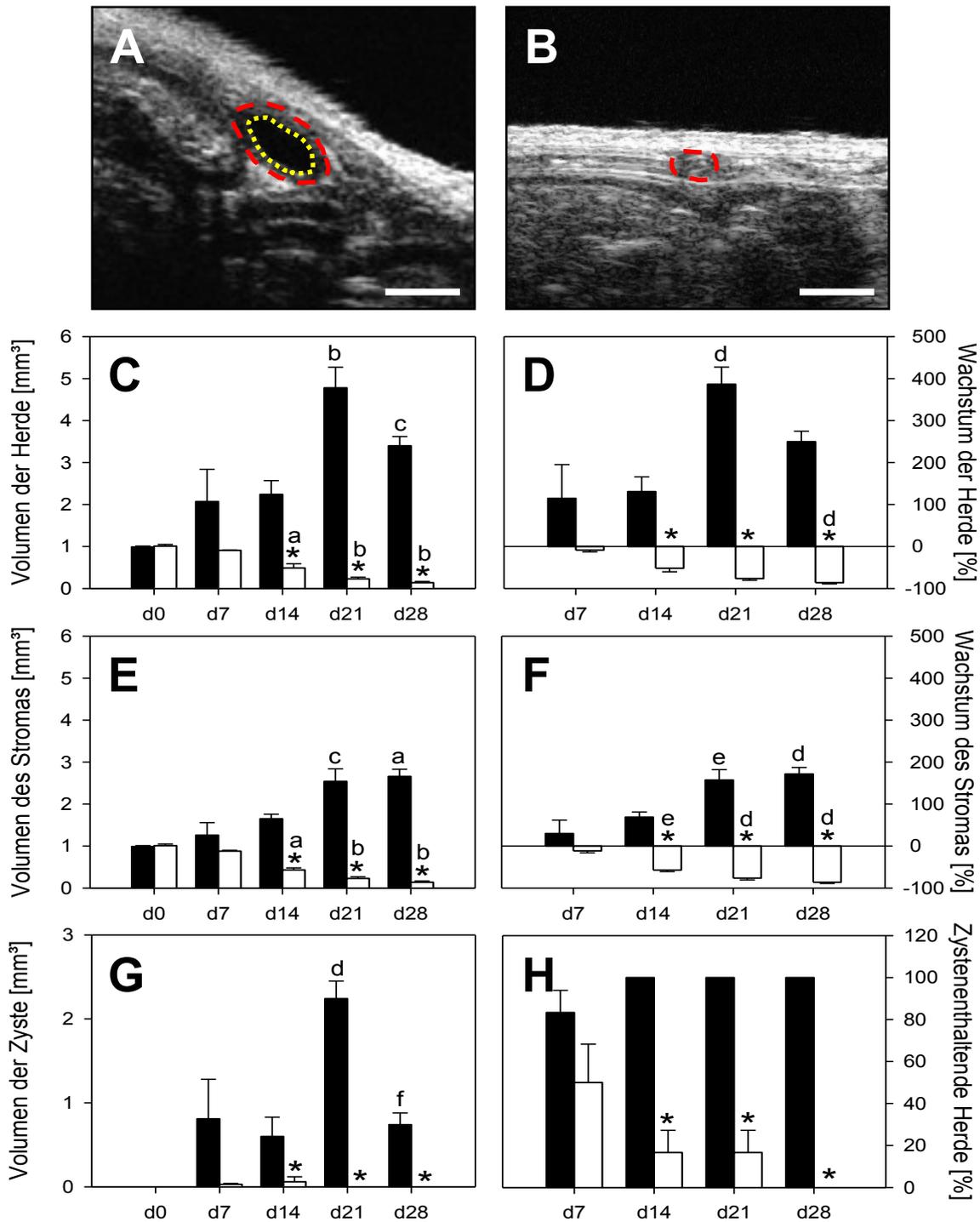


Abbildung 29: Hochauflösende Ultraschallbilder subperitonealer Endometrioseherde 28 Tage nach Transplantation von Uterusstanzen (Herdgrenze mit roter Linie markiert; Zystengrenze mit gelber Linie markiert) in die Bauchhöhle von unbehandelten (A) oder ovariectomierten (B) C57BL/6-Mäusen ($n = 6$). C-H: Gesamtvolumen der Herde (C, in mm³), Herdwachstum (D, in %), Volumen des Stromagewebes (E, in mm³), Stromawachstum (F, in %), Zystenvolumen (G, in mm³) und Anteil zystenenthaltender Herde (H, in %). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch subperitoneale Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von unbehandelten (schwarze Balken) oder ovariectomierten (weiße Balken) C57BL/6-Mäusen induziert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte die Untersuchung mittels des hochauflösenden Ultraschallgeräts Vevo770. Skalierung: A, B = 860µm. Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$ versus unbehandelte Tiere; ^a $P < 0,05$ versus Tag 0 und 7; ^b $P < 0,05$ versus Tag 0, 7 und 14; ^c $P < 0,05$ versus Tag 0; ^d $P < 0,05$ versus Tag 7 und 14; ^e $P < 0,05$ versus Tag 7; ^f $P < 0,05$ versus Tag 21.

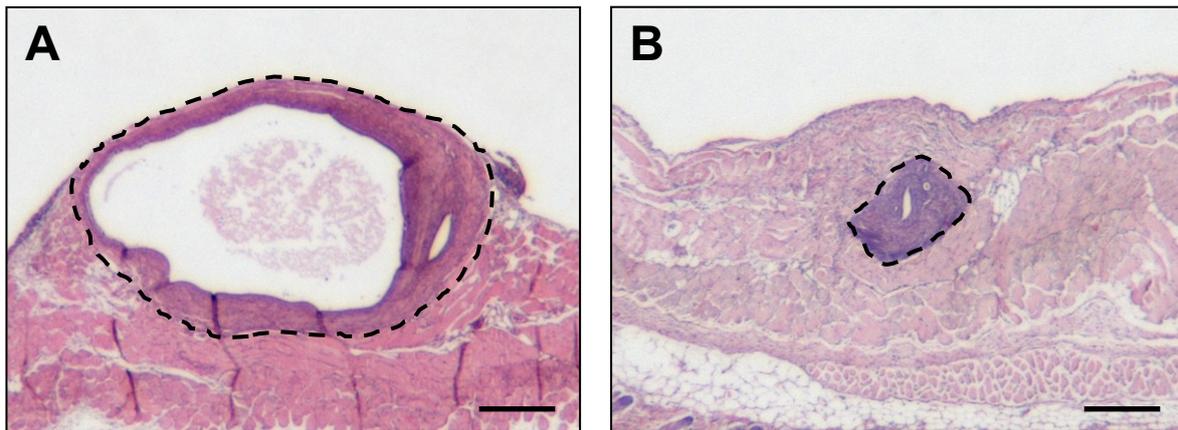


Abbildung 30: Histologische Schnitte von Endometrioseherden (Herdgrenze durch schwarz gestrichelte Linie markiert) am Tag 28 (HE-Färbung). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch subperitoneale Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von unbehandelten (**A**) oder ovariectomierten (**B**) C57BL/6-Mäusen induziert. Obwohl die Endometrioseherde der ovariectomierten Versuchsgruppe geschrumpft sind, können die zystischen und stromalen Gewebeanteile gut voneinander abgegrenzt werden (**B**). Skalierung: 190 μ m.

4.3.3. Danazol-Therapie im subperitonealen Endometriosemodell

Im letzten Versuchsteil dieses Studienabschnitts wurde der Einfluss einer anti-östrogenen Therapie mit Danazol auf das Wachstum subperitonealer Endometrioseherde untersucht. Hierzu wurde eine Versuchsgruppe täglich mit 100mg/kg Danazol behandelt. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle.

Ultraschallaufnahmen am Tag der Induktion der Endometrioseherde zeigten in beiden Gruppen in der Bauchwand homogene Gewebemassen (Abb. 31C). Die sich nach der Induktion in Danazol-behandelten Mäusen entwickelnden Endometrioseherde wiesen eine signifikante Abnahme des Volumens und des Wachstums im Vergleich zu den unbehandelten Tieren über den Untersuchungszeitraum von 28 Tagen auf (Abb. 31A-D). Dies war vor allem durch die Abnahme des Stromagewebes bedingt (Abb. 31E und F). Weiterhin wurde die Abnahme des Volumens der Endometrioseherde in den Danazol-behandelten Mäusen durch einen signifikant reduzierten Anteil zystenenthaltender Herde verursacht. Am Tag 28 waren in den Herden der Danazol-behandelten Mäuse sonographisch keine Zysten mehr nachweisbar (Abb. 31G und H).

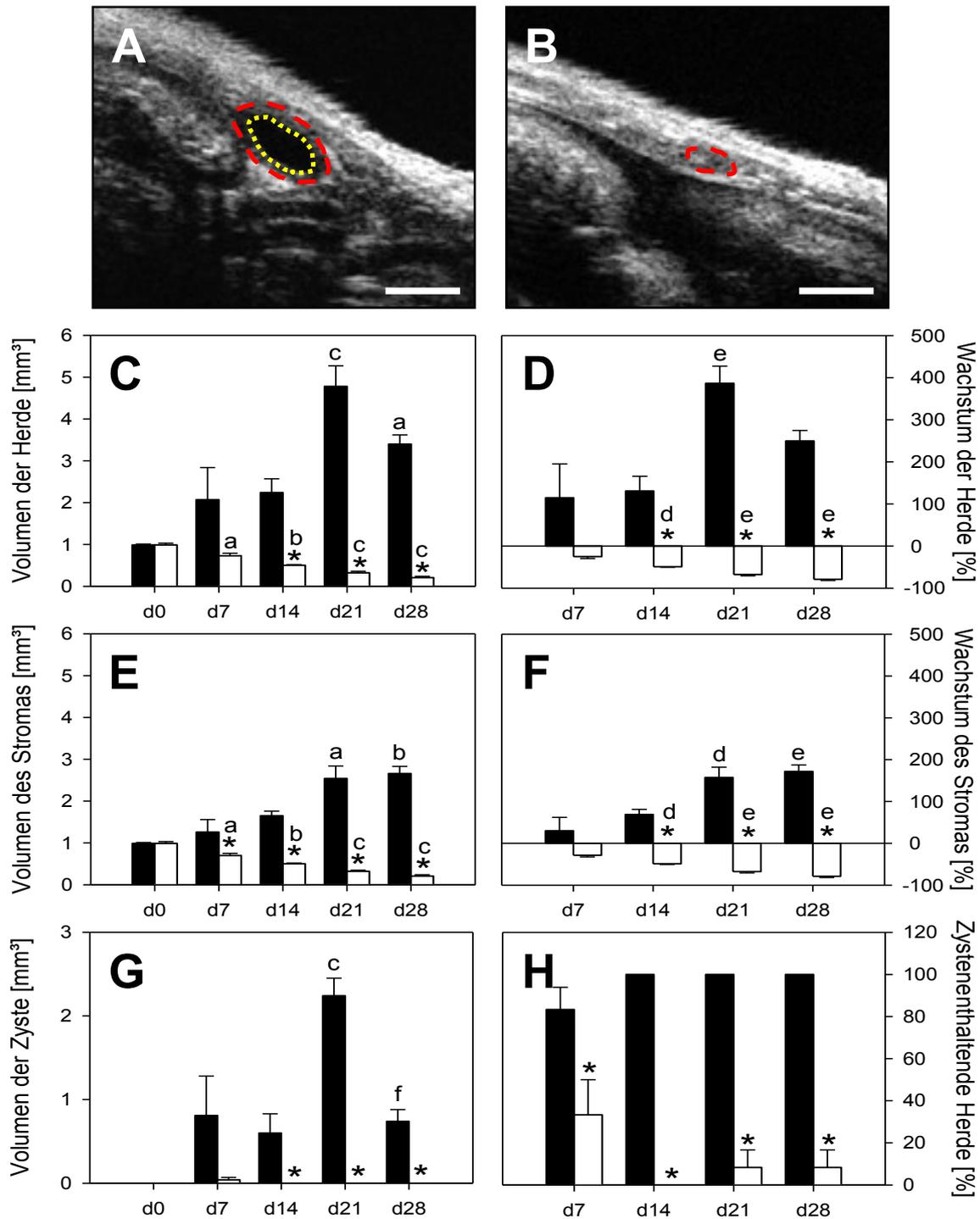


Abbildung 31: Hochauflösende Ultraschallbilder subperitonealer Endometrioseherde 28 Tage nach Transplantation von Uterusstanzen (Herdgrenze mit roter Linie markiert; Zystengrenze mit gelber Linie markiert) in die Bauchhöhle von unbehandelten (A) und Danazol-behandelten (B) C57BL/6-Mäusen ($n = 6$). C-H: Gesamtvolumen der Herde (C, in mm³), Herdwachstum (D, in %), Volumen des Stromagewebes (E, in mm³), Stromawachstum (F, in %), Zystenvolumen (G, in mm³) und Anteil zystenenthaltender Herde (H, in %). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch subperitoneale Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle unbehandelter (schwarze Balken) und Danazol-behandelter (weiße Balken) C57BL/6-Mäuse induziert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgte die Untersuchung mittels des hochauflösenden Ultraschallgeräts Vevo770. Skalierung: A, B = 860µm. Mittelwert \pm SEM; * $P < 0,05$ versus unbehandelte Tiere; ^a $P < 0,05$ versus Tag 0; ^b $P < 0,05$ versus Tag 0 und 7; ^c $P < 0,05$ versus Tag 0, 7 und 14; ^d $P < 0,05$ versus Tag 7; ^e $P < 0,05$ versus Tag 7 und 14; ^f $P < 0,05$ versus Tag 21.

Die histologischen Schnitte 28 Tage alter Endometrioseherde der Danazol-behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Tieren stark regredierte Herde. Allerdings wiesen die Herde der Danazol-behandelten Mäuse auch zu diesem Zeitpunkt noch Zysten auf (*Abb. 32A und B*). Diese waren allerdings sehr klein und konnten aufgrund ihrer geringen Größe mit der Ultraschallbildgebung nicht mehr detektiert werden (*Abb. 31B, G und H*).

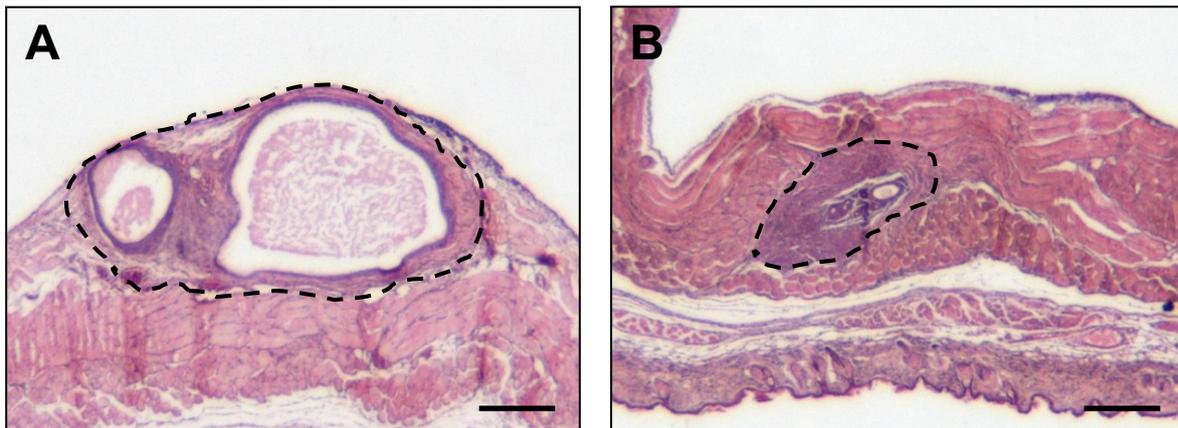


Abbildung 32: Histologische Schnitte von Endometrioseherden (Herdgrenze durch schwarz gestrichelte Linie markiert) am Tag 28 (HE-Färbung). Die Endometrioseherde wurden chirurgisch durch subperitoneale Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle von unbehandelten (**A**) und Danazol-behandelten (**B**) C57BL/6-Mäusen induziert. Obwohl die Endometrioseherde der Danazol-behandelten Mäuse geschrumpft sind, können sie noch gut vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden. Allerdings sind die darin enthaltenen zystisch dilatierten Drüsen aufgrund ihrer sehr kleinen Größe im Ultraschall nicht mehr detektierbar. Skalierung: 190µm.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden erstmals Endometrioseherde in der Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen mit Hilfe des hochauflösenden Ultraschallsystems Vevo770 analysiert. Dabei wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Mit der hochauflösenden Ultraschallbildgebung ist es leicht möglich, intra-peritoneale Endometrioseherde repetitiv und nicht-invasiv zu detektieren, sodass die Zahl der verwendeten Mäuse im Tierexperiment deutlich reduziert werden kann. In den Ultraschallaufnahmen können erstmals Stroma- und Zystenanteile der Endometrioseherde differenziert werden. Weiterhin sind mit Hilfe dieser Technik Verwachsungen der Herde mit dem umliegenden Gewebe sehr gut darstellbar.

2. Sowohl die Intra- als auch die Interobserver-Variabilität der Volumenmessungen von Endometrioseherden mittels des hochauflösenden Ultraschallsystems ist gering. So weisen Volumenmessungen, die wiederholt von einem Untersucher im Abstand von einem Monat durchgeführt werden, eine sehr gute Korrelation auf. Weiterhin zeigen die Volumenmessungen, die von unabhängigen Untersuchern durchgeführt werden, eine sehr gute Übereinstimmung ohne größere Messabweichungen.
3. Die Volumenmessungen von Endometrioseherden mit Hilfe des hochauflösenden Ultraschallsystems korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen herkömmlicher Messmethoden. Allerdings unterschätzt die Volumenbestimmung der Endometrioseherde mittels Histologien im Vergleich zu ultraschallbasierten Volumenmessungen grundsätzlich die Größe der Herde, was durch eine Schrumpfung der Gewebepräparate während des Fixierungsprozesses erklärt werden kann.
4. Endometrioseherde, die sich aus syngen oder autolog transplantierten Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen entwickeln, weisen unabhängig vom Transplantationsmodus ein vergleichbares Wachstum auf. Allerdings wirkt sich die initiale räumliche Orientierung der transplantierten Uterusstanzen unmittelbar auf die Ausbildung der Herde aus. So weisen Herde, die sich aus Uterusstanzen entwickeln, deren Perimetrium an das Peritoneum der Bauchwand fixiert wird, ein signifikant gesteigertes Herdwachstum im Vergleich zu Uterusstanzen auf, deren Endometrium an der Bauchwand anliegt. Dies geht mit einer signifikant erhöhten Anzahl PCNA- und CD31-positiver Zellen in diesen Herden einher. Weiterhin besitzen Endometrioseherde, die sich aus 3mm-Uterusstanzen entwickeln, im Vergleich zu Herden, die sich aus 2mm-Uterusstanzen entwickeln, über den gesamten Untersuchungszeitraum ein größeres Herdvolumen. Das prozentuale Wachstum der Herde, die sich aus 3mm-Uterusstanzen entwickeln, ist jedoch im Vergleich zu den Herden der 2mm-Uterusstanzen deutlich reduziert.

5. Subperitoneale Endometrioseherde weisen im Vergleich zu intraperitonealen Herden ein homogeneres und gesteigertes Wachstumsverhalten auf. In allen Herden, die sich aus subperitoneal transplantierten Uterusstanzen entwickeln, können Zysten detektiert werden.

6. In ovariectomierten und Danazol-behandelten Mäusen regredieren subperitoneale Endometrioseherde über den Untersuchungszeitraum. Dies zeigt, dass auch die subperitonealen Endometrioseherde hormonabhängig sind.

5. Diskussion

5.1. Evaluierung des hochauflösenden Ultraschallsystems

Vevo770 zur Analyse von Endometrioseherden im Mausmodell

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde erstmalig die hochauflösende Ultraschallbildgebung für die in vivo-Analyse von Endometrioseherden in Mäusen etabliert. Durch die Verwendung eines 40MHz-Schallkopfes mit einer Auflösung von 30µm und einer Fokustiefe von 6mm war mit dieser Technik eine repetitive, nicht-invasive Darstellung wachsender Endometrioseherde leicht möglich, wobei ein guter Gewebekontrast auch ohne die i.v. Gabe von Kontrastmitteln erreicht werden konnte. Die Versuchstiere tolerierten die wiederholten Ultraschalluntersuchungen sehr gut. Dabei wurde eine Isofluran-Gasnarkose eingesetzt, die im Vergleich zu einer Injektionsnarkose wesentlich schonender ist. Der größte Vorteil der ultraschallbasierten Analyse von Endometrioseherden im Vergleich zu konventionellen Methoden wie Messschieber oder Histologie ist die Nicht-Invasivität des Verfahrens. Es ist daher möglich, die Zahl der verwendeten Mäuse im Tierexperiment deutlich zu reduzieren und dabei gleichzeitig wesentlich mehr Ergebnisse aus individuellen Tieren zu gewinnen. Die geringe Intra- und Interobserver-Variabilität der Volumenmessungen einzelner Herde mittels Ultraschall ist weiterhin ein Indikator für die Verlässlichkeit des Analyseverfahrens. Entsprechend stellt die hochauflösende Ultraschalluntersuchung ein ideales Verfahren zur Analyse von Endometrioseherden in präklinischen, tierexperimentellen Studien dar.

In den meisten experimentellen Studien werden Endometrioseherde durch Transplantation von Endometrium an ektope Stellen induziert, da eine spontane Ausbildung von Endometrioseherden eine Menstruation voraussetzt, wie sie nur beim Menschen und einigen Primaten vorkommt (*Grümmer, 2006*). In der Vergangenheit wurde beispielsweise die Chorioallantois-Membran des Hühnereis (*Maas et al., 2001; Hull et al., 2003; Nap et al., 2003*) oder die Rückenhautkammerpräparation des Syrischen Goldhamsters (*Laschke et al., 2006, 2007, 2008*) als Empfängergewebe für solche Endometrium-Transplantationen verwendet. Beide Modelle haben den Vorteil, dass Endometrioseherde damit wiederholt und nicht-invasiv untersucht werden können. Allerdings sind diese Modelle nur in einem Zeitraum von wenigen Tagen bis Wochen verwendbar. Ein weiterer Nachteil dieser Modelle ist die

unphysiologische Umgebung für die Endometrioseherde, die sich normalerweise in der Bauchhöhle befinden.

Eine Alternative ist die direkte Transplantation von Endometrium in die Bauchhöhle von Nagern. Hierzu muss jedoch eine Laparotomie durchgeführt werden, wodurch eine chirurgisch induzierte Entzündung und Wundheilung verursacht wird. Dies verändert die physiologische Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit, wodurch die Entwicklung intraperitonealer Endometrioseherde beeinflusst werden kann (*Allhorn et al., 2008*). Wiederholte Laparotomien eines Versuchstieres zur repetitiven Untersuchung der Endometrioseherde können die Entzündungsreaktion dabei noch weiter verstärken. Daher werden in vielen Studien, die diesen Versuchsansatz verwenden, zu einzelnen Versuchszeitpunkten ganze Tiergruppen zur Analyse getötet, um wiederholte Laparotomien zu vermeiden.

Zur Lösung dieses Problems entwickelten *Becker et al. (2006)* ein neues Modell der intraperitonealen Endometriose, das eine nicht-invasive Beurteilung von Endometrioseherden mit Hilfe der Biolumineszenz-Technik ermöglicht. Hierfür wird jedoch Endometrium von Luciferase-exprimierenden transgenen Mäusen verwendet, welches in Wildtyp-Mäusen nach systemischer Injektion von Luciferin selektiv nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu bietet die in der vorliegenden Arbeit angewandte Ultraschalltechnik den Vorteil, dass die Untersuchungen nicht in transgenen Mausstämmen durchgeführt werden müssen.

Zur chirurgischen Induktion intraperitonealer Endometrioseherde wurden in dieser Arbeit Uterusgewebestücke an die laterale Bauchwand angenäht, um so optimale Bedingungen für wiederholte Ultraschalluntersuchungen zu schaffen. Allerdings muss bei diesem Ansatz berücksichtigt werden, dass das verwendete Nahtmaterial zur Fixierung der Uterusgewebestücke eine mehr oder weniger starke Fremdkörperreaktion hervorruft, welche die Entwicklung der Herde beeinflussen kann. Eine mögliche Alternative ist die Induktion von Endometrioseherden durch intraperitoneale Injektion von Endometriosefragmenten (*Hirota et al., 2008; Styer et al., 2008*). Dabei ist es jedoch wesentlich schwieriger und zeitaufwendiger, die wahllos verteilten Endometriumfragmente mit Hilfe der Ultraschallbildgebung zu finden und zu analysieren. Da frühere Studien gezeigt haben, dass sich angenähte und nicht angenähte Herde vergleichbar verhalten (*Becker et al., 2006*), sollten zukünftige Ultraschallstudien im Mausmodell an chirurgisch induzierten Endometrioseherden durchgeführt werden.

Histologisch sind Endometrioseherde durch zystisch dilatierte Endometriumdrüsen charakterisiert, welche von einem gut vaskularisierten endometrialen Stroma umgeben sind (Albee et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen diesen beiden Gewebeanteilen mit Hilfe der hochauflösenden Ultraschallbildgebung sehr gut differenziert werden. Dementsprechend war eine Quantifizierung des Wachstums der endometrialen Zysten und des Stromas über den Untersuchungszeitraum von 4 Wochen möglich. Es zeigte sich, dass ein stromales Wachstum lediglich bis zum 7. Tag erfolgte, wohingegen im weiteren Verlauf die Größenzunahme der Herde hauptsächlich durch eine Volumenzunahme der Zysten verursacht wurde. Dies deutet darauf hin, dass das initiale Anwachsen der Herde in der Bauchhöhle mit einer gesteigerten zellulären Proliferation in den Herden einhergeht, während im weiteren Zeitverlauf eine Phase folgt, die durch eine gesteigerte Sekretion der endometrialen Drüsen charakterisiert ist. Dies sollte beachtet werden, wenn Therapien zur Behandlung der Endometriose getestet werden, da hierbei sowohl die Zellproliferation als auch die Sekretionsaktivität der Endometrioseherde analysiert werden muss. Dies ist mit Hilfe der hochauflösenden Ultraschalltechnik nun erstmals leicht möglich.

Zur ultraschallbasierten Volumenmessung von Endometrioseherden erfolgt zunächst die Festlegung von Schnittabständen, in denen zweidimensionale Bilder der Herde aufgenommen und vermessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Schnittabstände auf die gemessenen Volumina einzelner Herde untersucht. Dabei besagt das Nyquist-Shannon'sche Abtasttheorem, dass zum Auffinden eines Objekts der Schnittabstand nicht kleiner als die Hälfte der Größe des zu messenden Objekts sein darf. Entsprechend ist ein Schnittabstand von $50\mu\text{m}$ erforderlich, um einen Herd mit einem Durchmesser von $\sim 100\mu\text{m}$ zu detektieren. In der vorliegenden Studie wiesen die kleinsten Herde einen Durchmesser von $\sim 800\mu\text{m}$ auf. Folglich war ein Schnittabstand von $400\mu\text{m}$ ausreichend, um die Herde zu finden. Allerdings wiesen die Volumina kleiner Endometrioseherde ($<1\text{mm}^3$), die mit $400\mu\text{m}$ oder $500\mu\text{m}$ Schnittabstand gemessen wurden, teilweise große Abweichungen von den Messungen mit einem Schnittabstand von $50\mu\text{m}$ auf. Dabei wurden die Volumina bei den Messungen mit größeren Schnittabständen in der Regel unterschätzt.

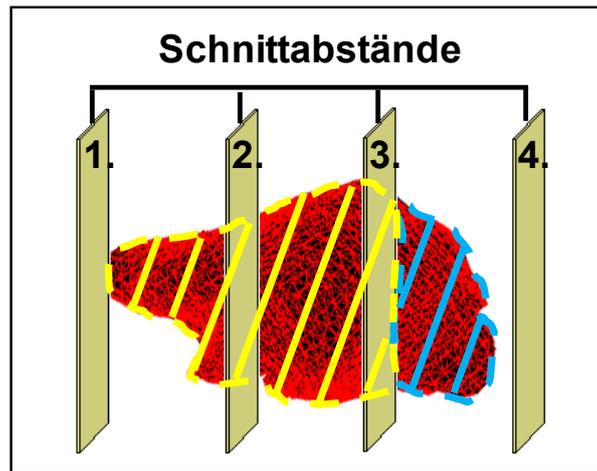


Abbildung 33: Schematische Darstellung eines Endometrioseherdes (rot) mit festgelegten Schnittabständen (grün). Hierbei beginnt der 1. Schnitt an einem Ende des Herdes und misst das Volumen zwischen den Schnittabständen (gelb markiert). Falls der Durchmesser des Herdes nicht genau ein Vielfaches der verwendeten Schnittabstände ist, wird das entgegengesetzte Ende nicht für die Volumenberechnung berücksichtigt (blau markiert).

Dies begründet sich dadurch, dass bei einem Schnittabstand von 400µm bzw. 500µm das Volumen der Herde nicht exakt bestimmt werden konnte. Falls der Durchmesser der Endometrioseherde nicht genau ein Vielfaches der verwendeten Schnittabstände war, berücksichtigte die manuelle Bildauswertung, die grundsätzlich mit einem Schnitt an einem Ende des Herdes begann, nicht das entgegengesetzte Ende des Herdes für die Volumenberechnung (Abb. 33). Im Verhältnis zum Gesamtvolumen eines Endometrioseherdes war dieses nicht gemessene Volumen am Ende des Herdes in kleineren Endometrioseherden im Vergleich zu großen Herden von größerer Bedeutung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ein großer Schnittabstand in kleinen Herden nicht exakt genug ist, wohingegen in großen Herden ein größerer Schnittabstand zur Volumenanalyse aus Zeitgründen bevorzugt werden kann.

Da die Bestimmung des Herdvolumens mit Hilfe eines Messschiebers eine weit verbreitete Vorgehensweise in experimentellen Endometriosestudien ist (Becker et al., 2008; Fainaru et al., 2008), wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit mit der Volumenmessung mittels Ultraschall verglichen. Es konnte eine sehr gute Korrelation der Ergebnisse beider Methoden nachgewiesen werden. Jedoch fanden sich für einzelne Endometrioseherde große Abweichungen zwischen den Messschieber- und Ultraschalldaten. Dies ist bei der Messschiebermethode auf die Volumenberechnung mittels der Ellipsoidformel zurückzuführen. Hierbei geht man davon aus, dass ein Endometrioseherd eine ellipsoide Form aufweist, was jedoch

nicht immer der Fall ist. Daher sollten Messschieberdaten zukünftig ausschließlich für die Bestätigung von Ultraschalldaten verwendet werden. Im Gegensatz dazu wurde das aus den Histologieschnitten mit Hilfe der trapezoiden Interpolation berechnete Gesamtvolumen der Endometrioseherde im Vergleich zu den ultraschallbasierten Volumina unterschätzt. Dies kann durch die Schrumpfung der Endometrioseherde während der Vor- bzw. Aufbereitung der Gewebeproben für die Histologie erklärt werden. Entsprechend wird das in vivo-Volumen der Herde viel besser durch die Messschieber- und Ultraschallmessungen wiedergegeben. Nichtsdestotrotz sind histologische Untersuchungen eine wichtige Methode zur Analyse bestimmter zellulärer Prozesse, z.B. wie Angiogenese, Zellproliferation, apoptotischer Zelltod oder Einwandern von Entzündungszellen in Endometrioseherde. Daher sollten histologische Untersuchungen durchaus auch weiterhin in Kombination mit Ultraschallanalysen durchgeführt werden.

5.2. Analyse verschiedener Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Endometrioseherden im intraperitonealen Modell

Da die Ausbildung einer spontanen Endometriose menstruationsabhängig ist (*Grümmer, 2006*), werden Endometrioseherde in nicht menstruierenden Nagern normalerweise durch syngene oder autologe Transplantation von Uterusgewebe erzeugt. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Transplantationsmodus das Anwachsen und die weitere Entwicklung der Herde nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis ist zunächst überraschend, da die Resektion eines Uterushorns im autologen Modell mit einer chirurgisch induzierten Entzündung einhergeht. Intraperitoneale Entzündungen mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Faktoren wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α oder Interleukin (IL)-6 in der Peritonealflüssigkeit werden ihrerseits als wichtiger pathogener Faktor für die Entwicklung einer intraperitonealen Endometriose angesehen (*Oral et al., 1996; Weiss et al., 2009*). Im Gegensatz dazu zeigten *Nowak et al. (2008)*, dass nach der Induktion einer intraperitonealen Entzündung durch Thioglycolat eine intraperitoneale Endometriose im Mausmodell nicht verstärkt wird. Folglich postulierten sie, dass Entzündungen im Bauchraum nicht von wesentlicher Bedeutung sind, um die Entwicklung einer Endometriose zu fördern. Basierend auf diesen Ergebnissen und den eigenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlussfolgert werden,

dass Endometrioseherde sowohl durch autologe als auch syngene Transplantation von Uterusgewebe in Mäuse induziert werden können, ohne dabei das Herdwachstum und die Ausbildung von Zysten maßgeblich zu beeinflussen. Allerdings hat die syngene Transplantation von Uterusgewebestücken eines Spenders in einen Empfänger den großen Vorteil, dass die Operation für das Empfängertier kürzer und weniger traumatisch ist. Weiterhin ist eine syngene Transplantation bei Studien notwendig, bei denen im Rahmen einer Target-Identifizierung Uterusgewebe von Wildtyp-Mäusen in Knockout-Mäuse mit identischem genetischem Hintergrund oder umgekehrt transplantiert werden muss.

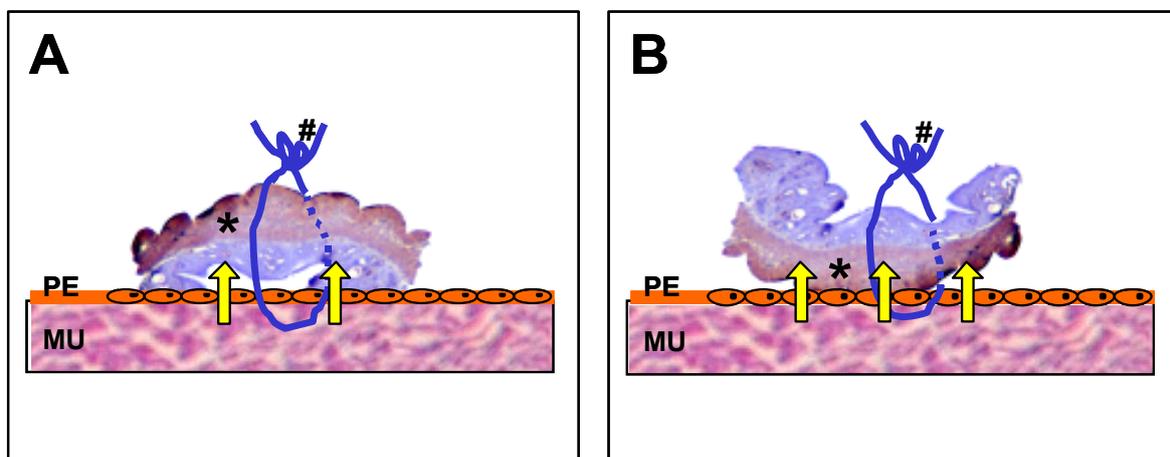


Abbildung 34: Schematische Darstellung einer angenähten Uterusstanze. Hierbei wurde entweder das Endometrium (A) oder das Perimetrium (B) in direktem Kontakt zum Peritoneum (PE) der Bauchwand angenäht. Die **gelben Pfeile** zeigen die Richtung an, aus denen neue Gefäße aus der Umgebung in die Transplantate einwachsen können (**Stern**; α -smooth-muscle-actin). **MU**, Bauchwandmuskulatur; **#**, 7-0 Prolenefaden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Entwicklung von Endometrioseherden in Abhängigkeit von der räumlichen Orientierung der transplantierten Uterusgewebestücke in der Bauchhöhle analysiert (Abb. 34). Dabei konnte gezeigt werden, dass Endometrioseherde ein gesteigertes Wachstum mit einer erhöhten Zahl proliferierender Stroma- und Drüsenzellen aufweisen, wenn das Perimetrium der Uterusgewebestücke mit dem darunterliegenden Myometrium an das Peritoneum der Bauchwand angenäht wird. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass der Gewebetyp der Uterusstanze, der unmittelbaren Kontakt zum Peritoneum der Bauchwand hat, die Entwicklung chirurgisch induzierter Endometrioseherde wesentlich beeinflusst. Dies ist dadurch erklärbar, dass das Endometrium der Uterusstanzen von einem Epithel bedeckt ist, das unter physiologischen Umständen das Uterus-

lumen auskleidet. Dieses luminale Epithel ist anti-adhäsiv und bildet damit eine Grenze aus, welche das Einnisten des Trophoblasten außerhalb eines besonderen rezeptiven Zeitfensters verhindert (Denker, 1994; Gipson et al., 2008). Außerdem stellt es eine wichtige immunologische Barriere dar, die einen Schutz gegen verschiedene Erreger bietet (Ochiel et al., 2008). Falls diese Epithelschicht in direktem Kontakt zum Peritoneum der Bauchwand steht, könnte dies möglicherweise das Einwachsen von neuen Blutgefäßen und Granulationsgewebe des Empfängertieres in das transplantierte Uterusgewebe verhindern. Im Gegensatz dazu weist das Perimetrium solche anti-adhäsiven Eigenschaften nicht auf. Entsprechend hatten in der vorliegenden Arbeit die Uterusstanzen, die mit dem Perimetrium an das Peritoneum der Bauchwand fixiert wurden, eine signifikant höhere Blutgefäßdichte am 7. Tag nach Transplantation. Basierend auf diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass bei der chirurgischen Induktion von Endometrioseherden die Uterusstanzen immer mit der gleichen räumlichen Orientierung an das Peritoneum angenäht werden sollten, um eine starke Variabilität des Wachstumsverhaltens der sich daraus entwickelnden Endometrioseherde zu vermeiden.

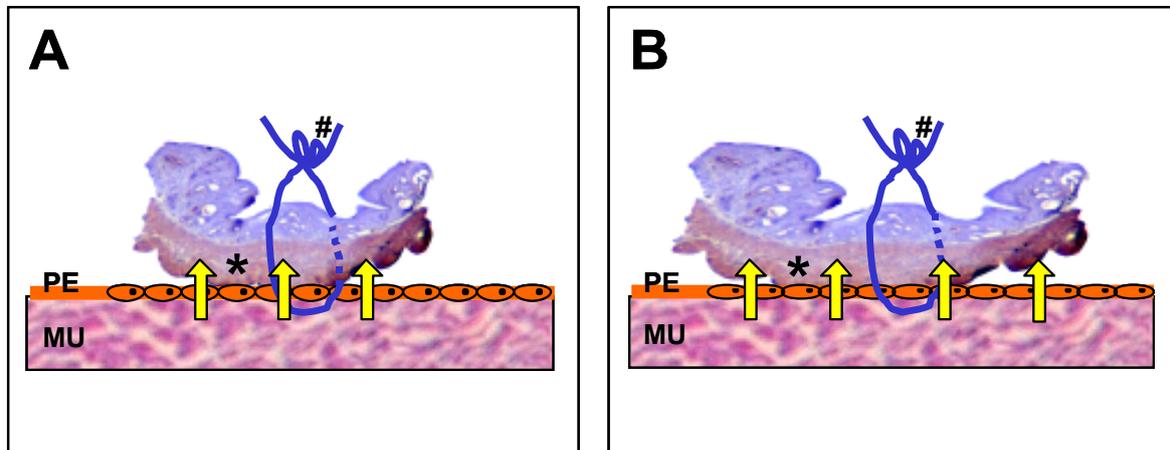


Abbildung 35: Die schematische Darstellung zeigt eine angenähte Uterusstanze. Hierbei wurden entweder 2mm (A) oder 3mm große (B) Uterusstanzen an das Peritoneum (PE) der Bauchwand angenäht. Die **gelben Pfeile** zeigen die Richtung an, aus denen neue Gefäße aus der Umgebung in die Transplantate einwachsen können (Stern; α -SMA). MU, Bauchwandmuskulatur; #, 7-0 Prolene-faden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Endometrioseherde, die sich aus 2mm großen Uterusstanzen entwickeln, eine höhere Wachstumsrate aufweisen als Herde, die von 3mm großen Uterusstanzen stammen (Abb. 35). Dies bestätigt eine frühere Studie von Laschke et al. (2005), in

der Endometrioseherde durch Transplantation von Endometriumfragmenten verschiedener Größe in die Rückenhautkammer Syrischer Goldhamster induziert und mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert wurden. In dieser Studie zeigten die großen im Vergleich zu den kleinen Transplantaten eine Wachstumsrate von ~60-70% versus ~80-90% (Laschke et al., 2005). Diese Ergebnisse können dadurch erklärt werden, dass die Endometriumfragmente während der ersten Tage nach Transplantation keine eigene funktionelle Gefäßversorgung besitzen und damit ausschließlich durch Sauerstoffdiffusion versorgt werden. Durch die längeren Diffusionswege des Sauerstoffs zu den Zellen im Zentrum großer Transplantate sind diese im Vergleich zu den kleineren Transplantaten während dieser kritischen Zeitspanne anfälliger für ischämische Schäden und Zelltod.

Andererseits konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil an zystenenthaltenden Herden in der Gruppe der 3mm-Uterusstanzen im Vergleich zur Gruppe der 2mm-Uterusstanzen am 28. Tag signifikant gesteigert war. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die großen Transplantate eine vermehrte Zahl an Drüsen enthalten, was die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Zysten erhöht. Nichtsdestotrotz empfiehlt es sich, in zukünftigen Studien 2mm große Uterusstanzen zu verwenden, da aus einem Uterushorn auf diese Weise eine größere Anzahl Stanzen gewonnen und somit Spendertiere eingespart werden können.

5.3. Etablierung eines subperitonealen Endometriosemodells

Das Ziel des letzten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit war es, ein neues, subperitoneales Endometriosemodell zu etablieren, bei dem die Endometrioseherde ein möglichst homogenes Wachstumsverhalten aufweisen. Hierzu wurden 2mm-Uterusstanzen in einen subperitonealen Tunnel der Bauchwand von C57BL/6-Mäusen transplantiert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise ein signifikant gesteigertes Wachstum und eine signifikant gesteigerte Zystenausbildung der sich entwickelnden Endometrioseherde im Vergleich zu intraperitonealen mit Naht fixierten Endometrioseherden erzielt wird.

Eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung und das Wachstum von Endometrioseherden ist die Angiogenese (Farquhar, 2007; Laschke et al., 2005; Laschke und Menger, 2007). Durch die Transplantation der Uterusstanzen unter das

Peritoneum der Bauchhöhle können im subperitonealen Modell aus allen Richtungen neue Gefäße in die transplantierten Uterusstanzen einsprossen. Daher sind die subperitonealen Transplantate im Vergleich zu den intraperitonealen Transplantaten bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt mit einem eigenen Gefäßnetzwerk versorgt (Abb. 36), welches eine optimale Blutversorgung gewährleistet.

Ein weiterer Vorteil des subperitonealen Endometriosemodells ist die geschützte Lage der transplantierten Uterusstanzen unter dem Peritoneum. Die Peristaltik der Darmschlingen oder Bewegungen von Milz, Leber und Blase können so keine Scherkräfte auf die Uterusstanzen ausüben und damit deren Anwachsen behindern.

Weiterhin wird im intraperitonealen Endometriosemodell durch das verwendete Nahtmaterial eine Fremdkörperreaktion ausgelöst (Delbeke et al., 1983; Beauchamp et al., 1988; Bakkum et al., 1995; Klinge et al., 1999; Laschke et al., 2009). Dies kann die Zusammensetzung der Peritonealflüssigkeit verändern und somit das Wachstumsverhalten der Herde beeinflussen. Dieser Faktor entfällt beim subperitonealen Modell, da hier die Uterusstanzen allein durch das Peritoneum an der Bauchwand gehalten werden und keine Fixierung durch eine Naht notwendig ist.

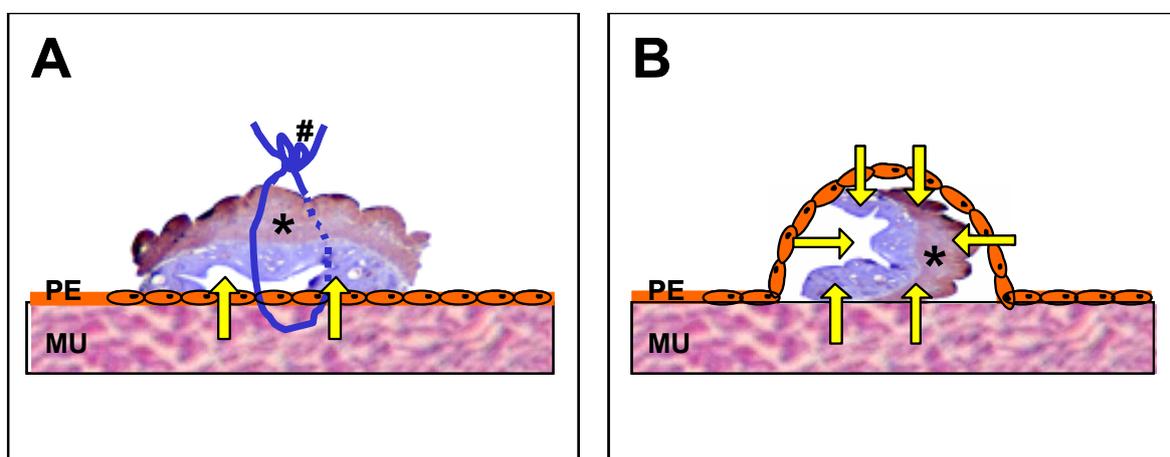


Abbildung 36: Die schematische Darstellung zeigt eine angenähte Uterusstanze. Hierbei wurde entweder das Endometrium mit direktem Kontakt an das Peritoneum angenäht (A) oder in einen subperitoneal Tunnel eingeschoben (B). Die **gelben Pfeile** zeigen die Richtung an, aus denen neue Gefäße aus der Umgebung in die Transplantate einwachsen können (**Stern**; α -SMA). **MU**, Bauchwandmuskulatur; **#**, 7-0 Prolenefaden.

Allerdings kann die subperitoneale Lage der Transplantate auch den Nachteil haben, dass die sich entwickelnden Endometrioseherde nicht in direktem Kontakt mit der Peritonealflüssigkeit stehen. Somit fehlt den Herden die Interaktion mit den in der

Bauchhöhle vorkommenden Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Immunabwehrzellen. Weitergehende Untersuchungen müssen daher zeigen, dass sich subperitoneal induzierte Endometrioseherde vergleichbar zu intraperitonealen Herden oder humanen Endometrioseherden verhalten.

Die Endometriose tritt bei 8-10% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter auf und bildet sich bei Frauen in der Menopause oder nach Ovariectomie wieder zurück (*Colette et al., 2009*). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Endometriose eine östrogenabhängige Erkrankung ist. Ein wichtiger Eckpfeiler bei der Behandlung der Endometriose stellt daher auch die Hemmung der ovariellen Östrogensynthese dar. Um zu prüfen, ob auch subperitoneal induzierte Endometrioseherde vergleichbare Eigenschaften wie humanen Endometrioseherde aufweisen, wurden in dieser Arbeit Tiere einzelner Gruppen einer bilateralen Ovariectomie bzw. einer Behandlung mit Danazol unterzogen. Danazol ist ein seit Jahren etabliertes Medikament zur Behandlung der Endometriose (*Friedlander, 1973; Puleo und Hammond, 1983*). Durch seine antigonadotrope Aktivität führt Danazol zur Hemmung der Follikelreifung und folglich zu einer verminderten Östradiolsekretion (*Rannevik und Thorell, 1984*). Hierdurch fehlt den Endometrioseherden das für ihr Wachstum wichtige Östradiol und die Herde bilden sich zurück. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Danazol-Dosis wurde mit der Formel von *Reagan-Shaw et al. (2008)* für das Mausmodell berechnet. Hierbei entspricht die in der Maus eingesetzte Dosis von 100mg/kg KG Danazol einer Dosis von 8mg/kg KG Danazol im Menschen. Sowohl in den ovariectomierten als auch in den Danazol-behandelten Tieren kam es durch die Reduktion von 17β -Östradiol zu einer Regression der Endometrioseherde. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch die subperitonealen Endometrioseherde entsprechend der humanen Endometrioseherde eine Hormonabhängigkeit aufweisen.

Zusammenfassend zeigte der letzte Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit, dass das neue, subperitoneale Endometriosemodell eine gute Alternative zum konventionellen, intraperitonealen Modell darstellt. Ein großer Vorteil ist dabei die Transplantation der Uterusstanzen ohne die Verwendung von Nahtmaterial sowie ein homogeneres, hormonabhängiges Wachstum der sich entwickelnden Herde.

5.4. Schlussfolgerungen

Mit dem hochauflösenden Ultraschallsystem Vevo770 ist es leicht möglich, nicht-invasiv und repetitiv Endometrioseherde in der Bauchhöhle von Mäusen zu untersuchen. Dabei können erstmals sowohl stromale als auch zystische Gewebeteile über den gesamten Beobachtungszeitraum voneinander abgegrenzt werden, wodurch sowohl das Proliferations- als auch das Sekretionsverhalten der Endometrioseherde erstmalig am lebenden Versuchstier untersucht werden kann. Durch die Nicht-Invasivität dieses Verfahrens müssen zu den einzelnen Versuchszeitpunkten keine Tiere für Endpunktanalysen der Herde getötet werden. Entsprechend trägt es dazu bei, die für zukünftige tierexperimentelle Endometriosestudien benötigte Tierzahlen maßgeblich zu reduzieren.

Mit Hilfe der hochauflösenden Ultraschallbildgebung wurde hier erstmals das Wachstumsverhalten subperitonealer Endometrioseherde analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich subperitoneale Endometriumherde im Vergleich zu konventionellen intraperitonealen Herden durch ein homogeneres, hormonabhängiges Wachstumsverhalten auszeichnen. Insofern könnten diese Herde zukünftig gut zur Testung neuer therapeutischer Wirkstoffe für die Behandlung der Endometriose eingesetzt werden.

Zusammenfassend konnten somit in der vorliegenden Arbeit mit der hochauflösenden Ultraschalldiagnostik und dem subperitonealen Endometriosemodell zwei neue wissenschaftliche Methoden in die Endometrioseforschung eingeführt werden, die zukünftig nicht nur neue Einblick in die Pathogenese dieser häufigen, gynäkologischen Erkrankung ermöglichen, sondern auch zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte einen wichtigen Beitrag leisten können.

6. Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen beim Menschen, die etwa 8-10% aller Frauen im reproduktionsfähigen Alter betrifft. Um die Pathogenese der Endometriose untersuchen und neue Medikamente präklinisch testen zu können, sind geeignete Kleintiermodelle notwendig. In vielen Nagerstudien werden intraperitoneale Endometrioseherde chirurgisch durch Transplantation von Uterusstanzen in die Bauchhöhle induziert. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein hochauflösendes Ultraschallsystem für die repetitive in vivo Analyse solcher Endometrioseherde in Mäusen eingeführt.

Zur Induktion intraperitonealer Endometrioseherde wurden isolierte Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen transplantiert. Je nach Versuchsgruppe wurden die Uterusstanzen autolog oder syngen transplantiert. Da diese sowohl aus Endometrium als auch Myometrium und Perimetrium bestanden, wurde untersucht, welchen Einfluss diese Gewebeschichten sowie die Größe und subperitoneale Lage der transplantierten Uterusstanzen auf das Wachstumsverhalten der sich daraus entwickelnden Endometrioseherde haben. Die Endometrioseherde sämtlicher Gruppen wurden am Tag der Transplantation der Uterusstanzen (Tag 0) sowie am 7., 14., 21. und 28. Tag mit dem hochauflösenden Ultraschallsystem Vevo770 analysiert. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden die Endometrioseherde mit dem Messschieber ausgemessen und im Anschluss für Histologieauswertungen entnommen. Zusätzlich erfolgte die Induktion von Herden, die am 3. und 7. Tag mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Immunhistochemie analysiert wurden.

Mit der hochauflösenden Ultraschalltechnik war es leicht möglich, intraperitoneale Endometrioseherde repetitiv und nicht-invasiv zu detektieren und dabei erstmals Stroma- und Zystenanteile der Herde zu differenzieren. Die Volummessungen der Endometrioseherde mit Hilfe des Ultraschallsystems korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen herkömmlicher Messmethoden. Weiterhin war sowohl die Intra- als auch die Interobserver-Variabilität der Volummessungen mittels Ultraschallbildgebung gering. Endometrioseherde, die sich aus syngen oder autolog transplantierten Uterusstanzen in die Bauchhöhle von C57BL/6-Mäusen entwickelten, wiesen unabhängig vom Transplantationsmodus ein vergleichbares Wachstum auf. Allerdings wirkte sich die initiale räumliche Orientierung der

transplantierten Uterusstanzen unmittelbar auf die Ausbildung der Herde aus. So wiesen Herde, die sich aus Uterusstanzen entwickeln, deren Perimetrium an das Peritoneum der Bauchwand fixiert wurde, ein signifikant gesteigertes Wachstum im Vergleich zu Uterusstanzen auf, deren Endometrium an der Bauchwand anlag. Dies ging mit einer signifikant erhöhten Anzahl PCNA- und CD31-positiver Zellen in diesen Herden einher, wobei PCNA die proliferierenden Zellen und CD31 Gefäßendothelzellen färbt. Weiterhin hatten Endometrioseherde, die sich aus 3mm-Uterusstanzen entwickelten, im Vergleich zu Herden, die sich aus 2mm-Uterusstanzen entwickelten, über den gesamten Untersuchungszeitraum ein größeres Herdvolumen. Ihr prozentuales Wachstum war jedoch im Vergleich zu den Herden der 2mm-Uterusstanzen deutlich reduziert. Subperitoneale Endometrioseherde wiesen im Vergleich zu intraperitonealen Herden ein homogeneres und gesteigertes Wachstumsverhalten auf. In ovariectomierten und Danazol-behandelten Mäusen regredierte die subperitoneale Endometrioseherde über den Untersuchungszeitraum. Danazol inhibiert die GnRH-Ausschüttung wodurch folglich der Östrogenspiegel im Blut fällt. Dies zeigt, dass auch die subperitoneale Endometrioseherde hormonabhängig sind.

Mit dem hochauflösenden Ultraschallsystem Vevo770 ist es erstmals möglich, sowohl das Proliferations- als auch Sekretionsverhalten von Endometrioseherden in der Bauchhöhle von Mäusen repetitiv zu untersuchen. Durch die Nicht-Invasivität dieses Verfahrens müssen zu den einzelnen Versuchszeitpunkten keine Tiere für Endpunktanalysen der Herde getötet werden. Entsprechend trägt die hochauflösende Ultraschallbildgebung dazu bei, die für zukünftige tierexperimentelle Studien benötigten Tierzahlen maßgeblich zu reduzieren. Weiterhin konnte erstmals das Wachstumsverhalten subperitonealer Endometrioseherde analysiert werden. Dabei wurde gezeigt, dass sich subperitoneale Endometrioseherde im Vergleich zu konventionellen intraperitonealen Herden durch ein homogeneres, hormonabhängiges Wachstumsverhalten auszeichnen. Zusammenfassend konnten somit in der vorliegenden Arbeit mit der hochauflösenden Ultraschall Diagnostik und dem subperitonealen Endometriosemodell zwei neue wissenschaftliche Methoden in die Endometrioseforschung eingeführt werden, die zukünftig nicht nur neue Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung ermöglichen, sondern auch zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte einen wichtigen Beitrag leisten können.

7. Summary

Endometriosis is a frequent gynecological disease in humans, which affects ~8-10% of women in reproductive age. To analyze the mechanisms involved in the pathogenesis of endometriosis and to identify new molecular targets for the development of effective therapies, small animal models are an important approach. In many rodent studies, intraperitoneal endometriotic lesions are surgically induced by transplantation of uterine tissue samples into the abdominal cavity. In the present study, high-resolution ultrasound imaging was introduced for the first time for the repetitive in vivo analysis of such endometriotic lesions in mice.

Intraperitoneal endometriotic lesions were surgically induced by syngeneic or autologous uterine tissue transplantation into the peritoneal cavity of C57BL/6 mice. The tissue samples did not only consist of endometrium, but also of myometrium and perimetrium of the uterus wall. Thus, it was analyzed how the spatial orientation of the transplants affects the establishment of endometriotic lesions. Moreover, the influence of the size and the subperitoneal position of transplanted uterine tissue samples was analyzed as crucial determinants of endometriotic lesion growth. The volume of developing lesions, their stroma and cysts were measured by means of the high-resolution ultrasonography system Vevo770 directly after transplantation as well as at days 7, 14, 21 and 28. At the end of the experiments, the animals were laparotomized for volume measurement of the endometriotic lesions by means of a caliper and histology. Additionally, endometriotic lesions were analyzed by means of intravital fluorescence microscopy and immunohistochemistry at days 3 and 7 after tissue transplantation.

The non-invasive sonography technology allowed for the repetitive and quantitative analysis of endometriotic lesion growth with a low intra- and interobserver variability. Moreover, it enabled the differentiation between endometrial cysts and stroma. The results of the sonography analyses correlated well with the measurements of lesion volume by caliper and histology. The mode of transplantation of uterine tissue samples did not affect the engraftment and development of endometriotic lesions. However, the establishment of endometriotic lesions was dependent on the spatial orientation of the transplants. In fact, lesion growth was increased when the perimetrium was sutured to the peritoneum. This was associated with an increased number of proliferating stromal and glandular cells

within the lesions. Furthermore, endometriotic lesions, which developed from 2mm uterine tissue samples, exhibited a higher growth rate when compared to lesions originating from 3mm tissue samples. Furthermore, in the present thesis the growth behaviour of subperitoneal endometriotic lesions could be analyzed for the first time by means of ultrasound imaging. Subperitoneal lesions showed a homogeneous and increased growth rate compared to intraperitoneal endometriotic lesions. Ovariectomy and danazol treatment induced a regression of subperitoneally implanted lesions, indicating an hormone-dependent lesion growth.

The results showed that high-resolution sonography is a reliable and easily applicable method for the repetitive analysis of intraperitoneal endometriosis in small laboratory animal models. This non-invasive technology allows for the first time detailed qualitative and quantitative analyses of growth, cyst development and adhesion formation of endometriotic lesions. Due to the non-invasiveness of ultrasonography, it is not necessary to sacrifice mice at different observation time points. Accordingly, the number of mice used in an experiment can be substantially reduced in future studies. Taken together, high-resolution ultrasound imaging represents a versatile tool in preclinical endometriosis research, not only to gain new insights into the pathophysiology of the disease, but also to develop future treatment strategies.

8. Literaturverzeichnis

1. **Albee RB Jr, Sinervo K, Fisher DT.** Laparoscopic excision of lesions suggestive of endometriosis or otherwise atypical in appearance: relationship between visual findings and final histologic diagnosis. *J Minim Invasive Gynecol* 2008; 15:32-37.
2. **Allhorn S, Böing C, Koch AA, Kimmig R, Gashaw I.** TLR3 and TLR4 expression in healthy and diseased human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6:40.
3. **Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C, Nozawa S.** Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol* 1994; 83:220-228.
4. **Athey PA, Diment DD.** The spectrum of sonographic findings in endometriomas. *J Ultrasound Med* 1989; 8:487-491.
5. **Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST, Isaacson K.** The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Hum Reprod* 1999; 14:3107-3111.
6. **Bacci M, Capobianco A, Monno A, Cottone L, Di Puppo F, Camisa B, Mariani M, Brignole C, Ponzoni M, Ferrari S, Panina-Bordignon P, Manfredi AA, Rovere-Querini P.** Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* 2009; 175:547-556.
7. **Baldi A, Campioni M, Signorile PG.** Endometriosis: pathogenesis, diagnosis, therapy and association with cancer (review). *Oncol Rep* 2008; 19:843-846.

8. **Bakkum EA, Dalmeijer RA, Verdel MJ, Hermans J, van Blitterswijk CA, Trimbos JB.** Quantitative analysis of the inflammatory reaction surrounding sutures commonly used in operative procedures and the relation to postsurgical adhesion formation. *Biomaterials* 1995; 16:1283-1289.
9. **Beauchamp PJ, Guzick DS, Held B, Schmidt WA.** Histologic response to microsuture materials. *J Reprod Med* 1988; 33:615-623.
10. **Becker CM, Sampson DA, Rupnick MA, Rohan RM, Efstathiou JA, Short SM, Taylor GA, Folkman J, D'Amato RJ.** Endostatin inhibits the growth of endometriotic lesions but does not affect fertility. *Fertil Steril* 2005; 84:1144-1155.
11. **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; 168:2074-2084.
12. **Becker CM, Rohwer N, Funakoshi T, Cramer T, Bernhardt W, Birsner A, Folkman J, D'Amato RJ.** 2-Methoxyestradiol inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and suppresses growth of lesions in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 2008; 172:534-544.
13. **Bischoff F, Simpson JL.** Genetic basis of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034:284-299.
14. **Bland JM, Altman DG.** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307-310.
15. **Bland JM, Altman DG.** Applying the right statistics: analyses of measurement studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 22:85-93.
16. **Braun DP, Gebel H, Dmowski WP.** Effect of danazol in vitro and in vivo on monocyte-mediated enhancement of endometrial cell proliferation in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1994; 62:89-95.

17. **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; 99:2851-2857.
18. **Caligioni CS.** Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009; 4:1-8.
19. **Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research.** Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, *U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Maryland, USA* 2002.
20. **Coleman BG, Arger PH, Mulhern CB Jr.** Endometriosis: clinical and ultrasonic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1979; 132:747-749.
21. **Colette S, Defrère S, Lousse JC, Van Langendonck A, Loumaye E, Donnez J.** Evaluation of estrogen treatment in an immunodeficient mouse endometriosis model. *Gynecol Obstet Invest* 2009; 68:262-268.
22. **Cramer DW, Missmer SA.** The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:11-22.
23. **Cummings AM, Metcalf JL.** Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 1995; 9:233-238.
24. **Dalal SJ, Estep JS, Valentin-Bon IE, Jerse AE.** Standardization of the Whitten Effect to induce susceptibility to *Neisseria gonorrhoeae* in female mice. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2001; 40:13-17.
25. **Delbeke LO, Gomel V, McComb PF, Jetha N.** Histologic reaction to four synthetic microsutures in the rabbit. *Fertil Steril* 1983; 40:248-252.
26. **Delorme S, Debus J.** Physikalische und technische Grundlagen. In: *Duale Reihe – Sonographie. Georg Thieme Verlag* 2005; 2-40.

27. **Denker HW.** Endometrial receptivity: cell biological aspects of an unusual epithelium. A review. *Ann Anat* 1994; 176:53-60.
28. **D'Hooghe TM, Bambra CS, Cornillie FJ, Isahakia M, Koninckx PR.** Prevalence and laparoscopic appearance of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*). *Biol Reprod* 1991; 45:411-416.
29. **D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, Dunselman GA, Evers HL, Koninckx PR.** Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 1994; 62:635-638.
30. **D'Hooghe TM, Bambra CS, De Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR.** The prevalence of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*) increases with the duration of captivity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:98-101.
31. **Dick EJ Jr, Hubbard GB, Martin LJ, Leland MM.** Record review of baboons with histologically confirmed endometriosis in a large established colony. *J Med Primatol* 2003; 32:39-47.
32. **Dmowski WP.** Danazol. A synthetic steroid with diverse biologic effects. *J Reprod Med* 1990; 35:69-74.
33. **Dogan E, Saygili U, Posaci C, Tuna B, Caliskan S, Altunyurt S, Saatli B.** Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib. *Fertil Steril* 2004; 82:1115-1120.
34. **Downey DB, Fenster A, Williams JC.** Clinical utility of three-dimensional US. *Radiographics* 2000; 20:559-571.
35. **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; 84:492-499.

36. **Elliot TL, Downey DB, Tong S, McLean CA, Fenster A.** Accuracy of prostate volume measurements in vitro using three-dimensional ultrasound. *Acad Radiol* 1996; 3:401-406.
37. **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; 22:522-529.
38. **Farquhar C.** Endometriosis. *BMJ* 2007; 334:249-253.
39. **Fenster A, Downey DB.** Three-dimensional ultrasound imaging and its use in quantifying organ and pathology volumes. *Anal Bioanal Chem* 2003; 377:982-989.
40. **Franchimont P, Cramillon C.** The effect of danazol on anterior pituitary function. *Fertil Steril* 1977; 28:814-817.
41. **Friedlander RL.** The treatment of endometriosis with Danazol. *J Reprod Med* 1973; 10:197-199.
42. **Gilja OH, Hausken T, Berstad A, Odegaard S.** Measurements of organ volume by ultrasonography. *Proc Inst Mech Eng H* 1999; 213:247-259.
43. **Gipson IK, Blalock T, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Allcorn S, Stavreus-Evers A, Gemzell K.** MUC16 is lost from the uterodome (pinopode) surface of the receptive human endometrium: in vitro evidence that MUC16 is a barrier to trophoblast adherence. *Biol Reprod* 2008; 78:134-142.
44. **Golan A, Winston RM, Dargenio R.** Experimental endometriosis: a microsurgical animal model in rats. *Isr J Med Sci* 1984; 20:1094-1096.

45. **Grümmer R, Schwarzer F, Balczyk K, Hess-Stumpp H, Regidor PA, Schindler AE, Winterhager E.** Peritoneal endometriosis: validation of an in-vivo model. *Hum Reprod* 2001; 16:1736-1743.
46. **Grümmer R.** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006; 12:641-649.
47. **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; 20:2092-2096.
48. **Hirota Y, Tranguch S, Daikoku T, Hasegawa A, Osuga Y, Taketani Y, Dey SK.** Deficiency of immunophilin FKBP52 promotes endometriosis. *Am J Pathol* 2008; 173:1747-1757.
49. **Hull ML, Charnock-Jones DS, Chan CL, Bruner-Tran KL, Osteen KG, Tom BD, Fan TP, Smith SK.** Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2889-2899.
50. **Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS.** Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 2005; 20:350-358.
51. **Igarashi M, Iizuka M, Abe Y, Ibuki Y.** Novel vaginal danazol ring therapy for pelvic endometriosis, in particular deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod* 1998; 13:1952-1956.
52. **Jones RC.** The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984; 106:282-288.

53. **Junqueira LC, Carneiro J.** Weibliche Geschlechtsorgane. In: Histologie. *Springer Berlin* 1996; 579-619.
54. **Kaupila A, Vierikko P, Isotalo H, Rönnerberg L, Vihko R.** Cytosol estrogen and progesterin receptor concentrations and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in the endometrium and endometriotic tissue. Effects of hormonal treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1984; 123:45-49.
55. **Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M, Schumpelick V.** Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias. *Eur J Surg* 1999; 165:665-673.
56. **Lang H, Wolf GK, Prokop M, Nuber B, Weimann A, Raab R, Zoller WG.** 3-dimensional sonography for volume determination of liver tumors-report of initial experiences. *Chirurg* 1999; 70:246-250.
57. **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.
58. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD.** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 2006; 149:137-144.
59. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD.** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 2007; 87:163-171.
60. **Laschke MW, Menger MD.** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007; 13:331-342.

61. **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; 23:2308-2318.
62. **Laschke MW, Häufel JM, Scheuer C, Menger MD.** Angiogenic and inflammatory host response to surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 91:497-507.
63. **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; 176:585-593.
64. **Laschke MW, Vorsterman van Oijen AE, Scheuer C, Menger MD.** In vitro and in vivo evaluation of the anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol. *Br J Pharmacol* 2011; 163:835-844.
65. **Liebich HG.** Weibliche Geschlechtsorgane. In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. *Schattauer Stuttgart* 1998; 284-302.
66. **Liess H, Roth C, Umgelter A, Zoller WG.** Improvements in volumetric quantification of circumscribed hepatic lesions by three dimensional sonography. *Z Gastroenterol* 1994; 32:488-492.
67. **Lutz H.** Physikalische Grundlagen. In: Ultraschallfibel Innere Medizin. *Springer Berlin* 2007; 1-8.
68. **Maas JW, Le Noble FA, Dunselman GA, de Goeij AF, Struyker Boudier HA, Evers JL.** The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to investigate the angiogenic properties of human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48:108-112.

69. **Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA, Evers JL.** Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 2001; 16:627-631.
70. **MacKenzie WF, Casey HW.** Animal model of human disease. Endometriosis. Animal model: endometriosis in rhesus monkeys. *Am J Pathol* 1975; 80:341-344.
71. **Malik E, Meyhöfer-Malik A, Berg C, Böhm W, Kunzi-Rapp K, Diedrich K, Rück A.** Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid. *Hum Reprod* 2000; 15:584-588.
72. **Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, Dallel R, Okamura K, Mage G.** Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevents implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats. *Fertil Steril* 2004; 82:1609-1615.
73. **Murakami K, Nomura K, Shinohara K, Kasai T, Shozu M, Inoue M.** Danazol inhibits aromatase activity of endometriosis-derived stromal cells by a competitive mechanism. *Fertil Steril* 2006; 86:291-297.
74. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Maas JW, Dunselman GA, de Goeij AF, Evers JL.** Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 2003; 18:30-34.
75. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL, Dunselman GA.** Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18:233-244.
76. **Neumannova M, Kauppila A, Vihko R.** Cytosol and nuclear estrogen and progestin receptors and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal and carcinomatous endometrium. *Obstet Gynecol* 1983; 61:181-188.

77. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Donnez J.** Early-stage endometriosis: adhesion and growth of human menstrual endometrium in nude mice. *Fertil Steril* 2000; 74:306-312.
78. **Noce JP.** Fundamentals of diagnostic ultrasonography. *Biomed Instrum Technol* 1990; 24:456-459.
79. **Nomura K, Murakami K, Shozu M, Nakama T, Yui N, Inoue M.** Local application of danazol-loaded hyaluronic acid hydrogel to endometriosis in a rat model. *Fertil Steril* 2006; 85:1157-1167.
80. **Nothnick WB, D'Hooghe TM.** Medical management of endometriosis: novel targets and approaches towards the development of future treatment regimes. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 55:189-198.
81. **Nowak NM, Fischer OM, Gust TC, Fuhrmann U, Habenicht UF, Schmidt A.** Intraperitoneal inflammation decreases endometriosis in a mouse model. *Hum Reprod* 2008; 23:2466-2474.
82. **Nunley WC Jr, Kitchin JD 3rd.** Congenital atresia of the uterine cervix with pelvic endometriosis. *Arch Surg* 1980; 115:757-758.
83. **Ochiel DO, Fahey JV, Ghosh M, Haddad SN, Wira CR.** Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: Role of Sex Hormones in Regulating Uterine Epithelial Cell Protection Against Pathogens. *Curr Womens Health Rev* 2008; 4:102-117.
84. **Oral E, Olive DL, Arici A.** The peritoneal environment in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1996; 2:385-398.
85. **Poulsen Nautrup C, Tobias R.** Atlas und Lehrbuch der Ultraschalldiagnostik bei Hund und Katze. *Schlütersche Verlagsanstalt* 1996.

86. **Puleo JG, Hammond CB.** Conservative treatment of endometriosis externa: the effects of danazol therapy. *Fertil Steril* 1983; 40:164-169.
87. **Rannevik G, Thorell JI.** The influence of danazol on pituitary function and on the ovarian follicular hormone secretion in premenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1984; 123:89-94.
88. **Rajkumar K, Schott PW, Simpson CW.** The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression. *Fertil Steril* 1990; 53:921-925.
89. **Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N.** Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22:659-661.
90. **Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V.** Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec* 2001; 264:317-324.
91. **Riccabona M, Nelson TR, Pretorius DH.** Three-dimensional ultrasound: accuracy of distance and volume measurements. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996a; 7:429-434.
92. **Riccabona M, Nelson TR, Pretorius DH, Davidson TE.** In vivo three-dimensional sonographic measurement of organ volume: validation in the urinary bladder. *J Ultrasound Med* 1996b; 15:627-632.
93. **Rossi G, Somigliana E, Moschetta M, Santorsola R, Cozzolino S, Filardo P, Salmaso A, Zingrillo B.** Dynamic aspects of endometriosis in a mouse model through analysis of implantation and progression. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 263:102-107.

94. **Saar M, Körbel C, Jung V, Suttman H, Grobholz R, Stöckle M, Unteregger G, Menger MD, Kamradt J.** Experimental orthotopic prostate tumor in nude mice: Techniques for local cell inoculation and three-dimensional ultrasound monitoring. *Urol Oncol* 2010; May 6. [in Druck].
95. **Sakas G, Walter S, Grimm M, Richtscheid M.** Free hand acquisition, reconstruction and visualization of 3D and 4D ultrasound. *Radiologe* 2000; 40:295-303.
96. **Sampson JA.** Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination on endometrial tissues into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927; 14:422-469.
97. **Schmidt G.** Physikalische und technische Grundlagen. In: Checkliste Sonographie. *Georg Thieme Verlag* 2005; 1-16.
98. **Schnorr B, Kressin M.** Embryonalhüllen des Vogels. In: Embryologie der Haustiere. *Enke* 2001; 107-110.
99. **Schumacher A, Khojeini E, Larson D.** ECHO parameters of diastolic dysfunction. *Perfusion* 2008; 23:291-296.
100. **Shamsuddin AK, Villa Santa U, Tang CK, Mohamed NC.** Adenocarcinoma arising from extragonadal endometriosis 14 years after total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy for endometriosis: report of a case with ultrastructural studies. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133:585-586.
101. **Sharpe KL, Bertero MC, Muse KN, Vernon MW.** Spontaneous and steroid-induced recurrence of endometriosis after suppression by a gonadotropin-releasing hormone antagonist in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:187-194.
102. **Simpson JL, Elias S, Malinak LR, Buttram VC Jr.** Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 137:327-331.

103. **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; 14:2944-2950.
104. **Stauber M, Weyerstahl T.** Endometriose. In: Duale Reihe – Gynäkologie und Geburtshilfe. *Georg Thieme Verlag KG* 2007; 310-317.
105. **Steinleitner A, Lambert H, Roy S.** Immunomodulation with pentoxifylline abrogates macrophage-mediated infertility in an in vivo model: a paradigm for a novel approach to the treatment of endometriosis-associated subfertility. *Fertil Steril* 1991; 55:26-31.
106. **Story L, Kennedy S.** Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 2004; 45:132-138.
107. **Strømme K, Stormark TA, Iversen BM, Matre K.** Volume estimation of small phantoms and rat kidneys using three-dimensional ultrasonography and a position sensor. *Ultrasound Med Biol* 2004; 30:1109-1117.
108. **Styer AK, Sullivan BT, Puder M, Arsenault D, Petrozza JC, Serikawa T, Chang S, Hasan T, Gonzalez RR, Rueda BR.** Ablation of leptin signaling disrupts the establishment, development, and maintenance of endometriosis-like lesions in a murine model. *Endocrinology* 2008; 149:506-514.
109. **Surrey ES, Halme J.** Direct effects of medroxyprogesterone acetate, danazol, and leuprolide acetate on endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Fertil Steril* 1992; 58:273-278.
110. **Tamaoka Y, Orikasa H, Sumi Y, Sakakura K, Kamei K, Nagatani M, Ezawa S.** Direct effect of danazol on endometrial hyperplasia in adenomyotic women: treatment with danazol containing intrauterine device. *Hum Cell* 2000; 13:127-133.

111. **Taylor GA.** Regional cerebral blood flow estimates in newborn lamb using amplitude-mode color Doppler ultrasound. *Pediatr Radiol* 1996; 26:282-286.
112. **Te Linde RW, Scott RB.** Experimental endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 60:1147-1173.
113. **Tomayko MM, Reynolds CP.** Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 24:148-154.
114. **Tong S, Cardinal HN, McLoughlin RF, Downey DB, Fenster A.** Intra- and inter-observer variability and reliability of prostate volume measurement via two-dimensional and three-dimensional ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24:673-681.
115. **Vernon MW, Wilson EA.** Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat. *Fertil Steril* 1985; 44:684-694.
116. **Weiss G, Goldsmith LT, Taylor RN, Bellet D, Taylor HS.** Inflammation in reproductive disorders. *Reprod Sci* 2009; 16:216-229.
117. **Wheeler JM.** Epidemiology of endometriosis-associated infertility. *J Reprod Med* 1989; 34:41-46.
118. **Wingfield M, Healy DL.** Endometriosis: medical therapy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1993; 7:813-838.
119. **Wirtzfeld LA, Wu G, Bygrave M, Yamasaki Y, Sakai H, Moussa M, Izawa JI, Downey DB, Greenberg NM, Fenster A, Xuan JW, Lacefield JC.** A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model. *Cancer Res* 2005; 65:6337-6345.
120. **Wood GP, Wu CH, Flickinger GL, Mikhail G.** Hormonal changes associated with Danazol therapy. *Obstet Gynecol* 1975; 45:302-304.

121. **Wong J, Gerscovich EO, Cronan MS, Seibert JA.** Accuracy and precision of in vitro volumetric measurements by three-dimensional sonography. *Invest Radiol* 1996; 31:26-29.
122. **Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC, Rogers MS.** Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod* 2009; 24:608-618.
123. **Zhang X, Yuan H, Deng L, Hu F, Ma J, Lin J.** Evaluation of the efficacy of a danazol-loaded intrauterine contraceptive device on adenomyosis in an ICR mouse model. *Hum Reprod* 2008; 23:2024-2030.
124. **Zondervan KT, Cardon LR, Kennedy SH.** The genetic basis of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13:309-314.

9. Anhang

9.1. Publikationen

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; 176:585-593.

Saar M, **Körbel C**, Jung V, Suttman H, Grobholz R, Stöckle M, Unteregger G, Menger MD, Kamradt J. Experimental orthotopic prostate tumor in nude mice: Techniques for local cell inoculation and three-dimensional ultrasound monitoring. *Urol Oncol* 2010. [Epub ahead of print]

Körbel C, Menger MD, Laschke MW. Size and spatial orientation of peritoneally fixed uterine tissue samples crucially determine growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. *Hum Reprod* 2010; 25:2551-2558.

Feng D, Welker S, **Körbel C**, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW. Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 2012. [Epub ahead of print]

Rudzitis-Auth J, **Körbel C**, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW. Xanthohumol inhibits growth and vascularization of developing endometriotic lesions. *Hum Reprod* 2012. [Epub ahead of print]

Ehrmantraut S, Naumann A, Willnecker V, Akinyemi S, **Körbel C**, Scheuer C, Meyer-Lindenberg A, Menger MD, Laschke MW. Vitalization of porous polyethylene (Medpor®) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. *Tissue Eng Part A* 2012. [Epub ahead of print]

9.2. Kongressbeiträge

Saar M, Kamradt J, Jung V, Suttman H, **Körbel C**, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G. Systematic analysis of inoculation techniques for orthotopic prostate tumours in mice and usability of three-dimensional ultrasound micro imaging to monitor tumour growth. *Eur Urol* 2009; 8:245.

Saar M, Jung V, Kamradt J, **Körbel C**, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G. Etablierung eines orthotopen Prostatatumormodells unter sonographischer Kontrolle des Tumorwachstums an der Nacktmaus. 50. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie, 2009.

*ausgezeichnet mit dem Werner-Staehler Gedächtnispreis.

Körbel C, Saar M, Kamradt J, Jung V, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G. Standards for orthotopic tumor cell inoculation into the prostate of nude mice. 13. Chirurgische Forschungstage, 2009.

Saar M, Jung V, Kamradt J, **Körbel C**, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G. 3D-Sonographie und standardisierte Zellinokulation bei der Etablierung eines orthotopen Prostatatumormodells an der Nacktmaus. *Urologe A* 2010; 49:98.

*ausgezeichnet mit dem Forschungspreis der Arbeitsgruppe „Urologische Forschung“ der Deutschen Gesellschaft für Urologie.

Saar M, Kamradt J, Jung V, **Körbel C**, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G. [Standardized orthotopic cell inoculation and three-dimensional ultrasound micro imaging to monitor engraftment and growth of different prostate tumors in nude mice.] *Urologe A* 2010; 49:420.

Saar M, **Körbel C**, Jung V, Grobholz R, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G, Kamradt J. Growth development of different orthotopic prostate tumours in nude mice using three-dimensional ultrasound micro imaging after standardised cell inoculation. *Eur Urol* 2010; 9:78.

Akinyemi S, **Körbel C**, Willnecker V, Laschke MW, Hoffmann M, Menger MD, Schick B, Naumann A. Ultrasound-based growth analysis of cultured chondrocyte aggregates. 8. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, 2010.

Saar M, **Körbel C**, Jung V, Kamradt J, Grobholz R, Stöckle M, Menger MD, Unteregger G. Standardisierte orthotope Zellinokulation und 3D-Sonographie zur Wachstumsbeobachtung unterschiedlicher Prostatatumore der Nacktmaus. 51. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie, 2010.

Schramm R, Tuche F, **Körbel C**, Langer F, Bouskela E, Menger MD. The recruitment of bone marrow-derived progenitor cells to the postischemic myocardium: Just an unmotivated pit stop in the microcirculation? *Br J Surg* 2010; 97:8.

Loretz B, Philippi C, Dong M, **Körbel C**, Beisner J, Muerdter T, Klotz U, Laschke MW, Menger MD, Schaefer UF, Lehr CM. Chitosan-modified PLGA nanoparticles for the delivery of telomerase inhibitor 2'-O-methyl-RNA to non-small-cell lung cancer cells and tumors. 37th CRS (Controlled Release Society) meeting in Portland, Oregon, 2010.

Körbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Laschke MW. High-resolution ultrasound imaging for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe München, 2010.

Körbel C, Menger MD, Laschke MW. Size and spatial orientation of peritoneally fixed uterine tissue samples crucially determine growth and cyst formation of surgically induced endometriotic lesions in mice. 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe München, 2010.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlichst danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger und PD Dr. Matthias W. Laschke für die Überlassung dieses interessanten Themas und der Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes arbeiten zu dürfen. Durch ihre stete Unterstützung und ihre konstruktive Kritik haben sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schuler danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Übernahme des Gutachtens.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, Freundlichkeit, Offenheit und Hilfsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön an meine Familie und meine Freunde, die jederzeit ein Wort der Aufmunterung für mich parat hatten sowie bedingungslos und unermüdlich meinen beruflichen Werdegang unterstützt haben.

Danke!!!

11. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Christina Körbel