

3. Einleitung

Die Endometriose ist definiert durch das Vorkommen von Endometrium-ähnlichem Gewebe, sogenannter Endometrioseherde, außerhalb der physiologischen Schleimhautauskleidung des Cavum uteri [Galle, 1989]. Dabei sind die Endometrioseherde ebenso wie das Endometrium des Uterus abhängig von den hormonellen Schwankungen des weiblichen Zyklus.

Gemäß der Lokalisation der Endometrioseherde kann eine Einteilung in drei verschiedene Gruppen erfolgen. Bei der Endometriosis genitalis interna, vorkommend in Uterusmuskulatur und Eileiter, besteht eine direkte Verbindung zur Schleimhaut der Gebärmutter. Die Endometriosis genitalis externa ist im weiblichen Becken lokalisiert, häufig in Ovarien und Douglasraum, seltener in der Vagina, im Perineum oder an ligamentären Strukturen. Bei der Endometriosis extragenitalis können sich Endometrioseherde sogar außerhalb des weiblichen Beckens befinden, beispielsweise in Lunge und Herz.

Mit einer Prävalenz von mehr als 10% ist die Endometriose eine der häufigsten gynäkologischen Erkrankungen bei Frauen im reproduktionsfähigen Alter, wobei ein familiär gehäuftes Auftreten feststellbar ist. In verschiedenen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Frauen mit kurzen und starken menstruellen Blutungen und solche ohne bisherige Entbindung ein erhöhtes Risiko aufweisen, an einer Endometriose zu erkranken [Viganò et al., 2004]. Die Symptome können in menstruelle, ovulatorische und reproduktive Dysfunktionen eingeteilt werden. Patientinnen mit menstruellen Beschwerden klagen am häufigsten über zyklusabhängige Bauchschmerzen, Dysmenorrhoe und Dyspareunie. Zu den ovulatorischen Funktionsstörungen zählen beispielsweise Anovulation sowie prämenstruelle Vorblutungen. Des Weiteren konnte bei Endometriose-Patientinnen eine erhöhte Rate von Infertilität nachgewiesen werden [Galle, 1989; Rawson, 1991].

Bisher ist es nicht gelungen, die Pathogenese der Erkrankung eindeutig zu klären. So werden verschiedene Entstehungsmöglichkeiten der Endometriose diskutiert. Die Metaplasie-Theorie [Meyer, 1919] geht davon aus, dass sich unter bestimmten Bedingungen aus embryonalem Zölomepithel Zellen mit Endometrium-ähnlicher Differenzierung ausbilden können. Auch immunologische Faktoren werden als Ursache der Endometriose diskutiert [Haney et al., 1981; Gazvani et al., 1998]. So ist es denkbar, dass versprengte Endometriumzellen von den körpereigenen Abwehrmechanismen nicht erkannt werden und somit an ektooper Stelle anwachsen und proliferieren können. Ebenso wird eine hämatogene und lymphogene Verschleppung des Endometriums diskutiert, wodurch es zu einer Art metastatischer Absiedelung der Zellen kommen soll [Halban, 1924; Giudice et al., 2004]. Dadurch ließe sich zum Beispiel das Entstehen einer Lungenendometriose erklären [Terada et al., 1999; Kiyon et al., 2002]. Momentan ist jedoch die Implantationstheorie von Sampson [1927] am meisten akzeptiert. Danach stammen die Endometrioseherde von Endometriumfragmenten, die während der Menstruation retrograd durch die Tuben in die Peritonealhöhle gelangen. Dort haften sie am Peritoneum an und proliferieren an ektooper Stelle.

Für das Überleben des versprengten endometrialen Gewebes ist eine adäquate Blutzufuhr essentiell, die eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Da die Angiogenese eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von Endometrioseherden ist [Shifren et al., 1996; Nap et al., 2004], wird die Endometriose den sogenannten angiogenen Erkrankungen zugeordnet [Groothuis et al., 2005; May und Becker, 2008].

Unter Angiogenese versteht man die Ausbildung neuer Gefäße aus einem vorexistierenden Blutgefäß [Folkman und Klagsbrun, 1987]. Es handelt sich hierbei um einen komplexen dynamischen Prozess [Risau, 1997; Carmeliet, 2000], bei dem Endothelzellen bereits vorbestehender Gefäße durch die Ausschüttung verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) aktiviert werden [Ferrara, 2000]. In Folge kommt es zur Migration und Proliferation der Endothelzellen in Rich-

tung des angiogenen Stimulus. Im weiteren Verlauf führt dies zur Ausbildung von Gefäßsprossen, die in das umgebende Bindegewebe wachsen. Nach Bildung eines Lumens lagern sich weitere Zellen wie Perizyten und Fibroblasten an diese sich neu formenden Gefäße an, was zur Stabilisierung der Gefäßwand beiträgt. Dieser Prozess wird u.a. durch FGF, Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Angiopoietin-1 (Ang-1) gesteuert [Fuchs et al., 2001]. Auf diese Weise entsteht schließlich ein hochdifferenziertes Gefäßnetzwerk aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen [Hudlicka, 1984].

Die Angiogenese spielt bei vielen pathologischen Vorgängen eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen beispielsweise Tumorwachstum und Metastasierung [Folkman, 1985; 1995], Wundheilung [Polverini et al., 1977; Greenburg und Hunt, 1978; Banda et al., 1982] und verschiedene Entzündungsprozesse [Jones et al., 1999; Dermond et al., 2001]. Physiologischerweise findet in den Körpergeweben gesunder Erwachsener die Gefäßneubildung nur noch in begrenztem Maße statt. Eine Ausnahme stellen die weiblichen Geschlechtsorgane dar. Die Follikulogenese [Tamanini und De Ambrogi, 2004], die zyklische Proliferation des Endometriums [Dallenbach-Hellweg, 1997] und die Schleimhautreaktion des Uterus nach erfolgter Implantation der Blastozyste [Motro et al., 1990] sind Beispiele für das schnelle und natürliche Gewebewachstum von Ovar, Uterus und Plazenta, das von der Entwicklung neuer Blutgefäße abhängig ist.

Durch zahlreiche Studien, welche die Angiogenese in Tumorgeweben untersuchten, ist heute bekannt, dass die Neuentwicklung von Blutgefäßen einem Gleichgewicht von angiogenen Stimulatoren und Inhibitoren unterliegt [Hanahan und Folkman, 1996]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene pro-angiogene Faktoren auch in der Pathogenese der Endometriose von wesentlicher Bedeutung sind. Zu diesen Faktoren werden unter anderem Interleukin-4 [OuYang et al., 2008], Interleukin-8 [Arici, 2002], Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) [Lousse et al., 2008], Cyr61 [Absenger et al., 2004; Gashaw et al., 2008], B-Lymphozyten Stimulator [Hever et al., 2007], FGF [Bourlev et al., 2006], PDGF [Fujimoto et al., 1999], die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) 1, 2 und 9, Ang-1 und -2 sowie VEGF [Di Carlo et

al., 2009; Machado et al., 2010] gezählt. Bei VEGF handelt es sich um einen der potentesten pro-angiogenen Faktoren, der die Neuentwicklung von Blutgefäßen in Endometrioseherden fördert. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass Endometriose-Patientinnen erhöhte VEGF-Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit aufweisen [Shifren et al., 1996; McLaren et al., 1996; 2000]. Weiterhin ist bekannt, dass eine bessere Durchblutung des umgebenden Gewebes zu einem schnelleren Anwachsen der Endometrioseherde führt. In frühen Stadien der Endometrioseherde, auch „red lesions“ genannt, lassen sich signifikant höhere Gefäßdichten und VEGF-Expressionen nachweisen. Spätere Stadien, auch als „black lesions“ bezeichnet, weisen hingegen eine geringere VEGF-Expression auf, die mit einer Fibrosierung und Inaktivierung der Herde einhergeht [Donnez et al., 1998].

Die derzeitige Therapie der Endometriose besteht einerseits darin, Endometrioseherde operativ zu entfernen und andererseits, die endogene Östrogenausschüttung zu vermindern. Bereits zur Anwendung kommen hier orale Kontrazeptiva, Gestagene und Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH)- Analoga [Nothnick und D'Hooghe, 2003; Fedele und Berlanda, 2004; Daguati et al., 2006; Tesone et al., 2008; Vercellini et al., 2008; Ferrero et al., 2009]. Allerdings stellt diese Therapie keinen ursächlichen Ansatz dar. Sie kann zwar Symptome wie z.B. zyklusabhängige Schmerzen mildern [Taskin et al., 1996; Kettel und Hummel, 1997], ist jedoch auch mit vielen Nebenwirkungen wie Hitzewallungen, Gewichtszunahme, einem erhöhten thromboembolischen Risiko [Tchaikovski und Rosing, 2010] und iatrogen induzierter Osteoporose assoziiert [Sagsveen et al., 2003]. Des Weiteren sind klinische Rezidivraten von bis zu 50% beschrieben worden [Becker et al., 2004]. Aus diesem Grund ist man auf der Suche nach neuen Behandlungskonzepten.

Die Entwicklung anti-angiogener Behandlungsstrategien könnte eine Möglichkeit darstellen, um die Nebenwirkungen einer antihormonellen Therapie zu vermeiden. So konnte bereits gezeigt werden, dass die kombinierte Inhibition von VEGF, FGF und PDGF effektiv die Angiogenese und Gefäßreifung in Endometrioseherden reduzieren kann [Laschke et al., 2006a]. Weiterhin ist bekannt, dass die Inhibition der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) zu einer Reduktion der Größe und Kapillardich-

te autologer endometrialer Transplantate führt, wobei durch diese Behandlung die Expression von VEGF reduziert und die Caspase-3-vermittelte Apoptose stimuliert wird [Laschke et al., 2007a]. Das Immunsuppressivum Rapamycin führt durch Inhibition der VEGF-vermittelten Neovaskularisierung und Zellproliferation ebenfalls zu einer Regression von Endometrioseherden [Laschke et al., 2006b].

Ein limitierender Faktor jeder anti-angiogenen Behandlungsstrategie ist jedoch die Tatsache, dass die Hemmung der Blutgefäßentwicklung nicht nur die Vaskularisierung des Zielgewebes betrifft, sondern auch die physiologische Angiogenese, welche bei Erwachsenen ausschließlich auf die weiblichen Reproduktionsorgane beschränkt ist, beeinflusst [Reynolds et al., 1992]. Dies kann gegebenenfalls schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen, wie menstruelle Störungen bis hin zur Infertilität. Daher ist es wichtig, bei der Etablierung neuer anti-angiogener Therapien auch die Wirkungen auf die Gewebe der weiblichen Geschlechtsorgane zu untersuchen.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche anti-angiogene Substanzen bezüglich ihrer therapeutischen Wirkung in der Tumorbehandlung analysiert. Einige davon gehören der Gruppe der Nahrungsmittelkomponenten an, wie zum Beispiel Vitamin E [Shklar et al., 1996; Woodson et al., 2002], Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) [Jung et al., 2001; Fassina et al., 2004], Genistein [Büchler et al., 2004] und Glycin [Rose et al., 1999a; 1999b; Amin et al., 2003].

Grüner Tee ist eines der am häufigsten konsumierten Getränke weltweit. Ihm werden viele gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben. Die chemische Hauptkomponente des Grünen Tees ist das Polyphenol EGCG [Yang et al., 2006]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Katechin mit hoher anti-oxidativer Aktivität für die Behandlung verschiedener Tumorarten eingesetzt werden kann [Lambert et al., 2005; Ju et al., 2007; Yang et al., 2007]. Dabei ist EGCG eine typische pleiotrope Substanz, die verschiedene zelluläre Mechanismen beeinflusst, welche an der Karzinogenese beteiligt sind. Hierzu zählen beispielsweise Mutation, Zellproliferation, Zellinvasion und apoptotischer Zelltod [Beltz et al., 2006; Khan et al.,

2006]. Weiterhin hemmt EGCG die Angiogenese sowohl in vitro als auch in vivo [Tang et al., 2001; Kondo et al., 2002; Tang et al., 2007; Zhu et al., 2007; Shankar et al., 2008]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft, dass EGCG nicht nur effektiv in der Prävention und Therapie von Krebs eingesetzt werden kann, sondern auch eine vielversprechende therapeutische Substanz für die Behandlung der Endometriose darstellt.

Glycin ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die u.a. in Schweinefleisch, Lachs, Hühnereiern und Walnüssen vorkommt. Sie wirkt als inhibitorischer Transmitter im zentralen Nervensystem [Rajendra et al., 1997]. Durch Aktivierung eines Glycin-gesteuerten Chloridkanals kann Glycin die lipopolysaccharid-stimulierte Produktion toxischer Mediatoren in Entzündungszellen reduzieren [Ikejima et al., 1997]. Zusätzlich berichteten Rose et al. [1999a], dass Glycin das Wachstum von B16-Melanomen in vivo inhibiert, ohne die Wachstumsraten von B16-Melanomzellen in vitro zu beeinflussen. Diese Hypothese wurde später in einer Studie von Amin et al. [2003] verifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Angiogenese während Wundheilung und Tumorwachstum durch diätätisch zugeführtes Glycin unterdrückt wird, was mit einer signifikant reduzierten Kapillardichte des Gewebes einherging. Folglich ist Glycin ebenfalls eine potente anti-angiogene Nahrungsmittelkomponente, welche nicht nur nützliche Effekte in der Tumorthherapie, sondern auch in der Therapie der Endometriose haben könnte.

Genistein ist ein Isoflavon, das in hohen Konzentrationen in Sojaprodukten gefunden wird. Aufgrund seiner chemischen Struktur, welcher der des Östradiols ähnelt, gehört es der Gruppe der Phytoöstrogene an [Caserta et al., 2008]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Genistein abhängig von der Konzentration des zirkulierenden endogenen Östrogens, sowohl pro-östrogene als auch anti-östrogene Effekte auf Endometrioseherde ausübt. Cotroneo und Lamartiniere [2001] berichteten, dass pharmakologische Injektionen von Genistein das Wachstum chirurgisch induzierter Endometrioseherde in Ratten fördern. Jedoch waren in dieser Studie die Tiere bilateral ovariectomiert und wiesen demzufolge nur geringe Mengen endogenen Östrogens auf. Im Gegensatz dazu konnten Yavuz et al. [2007] nachweisen, dass

Genistein die Regression von Endometrioseherden in nicht-ovarektomierten Ratten verursacht. Weiterhin ist bekannt, dass Genistein die endotheliale Zellproliferation in vitro [Piao et al., 2006; Guo et al., 2007] und die Tumorangiogenese in vivo inhibiert [Büchler et al., 2004; Gu et al., 2005; Farina et al., 2006]. Folglich könnte die beobachtete Regression Genistein-behandelter Endometrioseherde auf der anti-angiogenen Aktivität dieses Phytoöstrogens beruhen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu analysieren, ob die Nahrungsmittelkomponenten EGCG, Glycin und Genistein als anti-angiogene Substanzen in der Behandlung der Endometriose eingesetzt werden können. Dazu wurde ein tierexperimentelles Endometriosemodell verwendet, welches es ermöglicht, die Entwicklung neuer Blutgefäße in transplantiertem, ektopem Endometrium direkt zu visualisieren und schrittweise zu untersuchen [Laschke et al., 2005]. Um den Grad der Spezifität potentieller anti-angiogener Effekte auf Endometrioseherde zu analysieren, wurde parallel dazu die Wirkung der eingesetzten Nahrungsmittelkomponenten auch auf die Angiogenese und Vaskularisierung transplantierte ovariieller Follikel getestet [Vollmar et al., 2001].

Bei den einzelnen Studien diente die freipräparierte, quergestreifte Skelettmuskulatur in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters als Empfänger-gewebe für die Transplantate [Endrich et al., 1980]. Mit Hilfe der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie [Laschke et al., 2002; 2005; Bordel et al., 2006; Laschke et al., 2006a; 2007a] ermöglicht es dieses Tiermodell, die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke innerhalb transplantierte Endometriumfragmente und ovariieller Follikel über einen 14-tägigen Zeitraum qualitativ und quantitativ in vivo zu untersuchen. Hierbei sind Netzwerkgröße, funktionelle Kapillardichte, Blutzellgeschwindigkeit und Durchmesser von neugebildeten Gefäßen wichtige Parameter zur Quantifizierung des angiogenen Prozesses. Des Weiteren geben histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen Aufschluss über die Morphologie des transplantierte Gewebes innerhalb der Rückenhautkammer, die Funktionalität verschiedener Zelltypen sowie die Expression angiogener Wachstumsfaktoren, Proliferations- und Apoptosemarker.