

7. Diskussion

7.1. Diskussion von Material und Methodik

7.1.1. Diskussion des Modells

Am Rückenhautkammermodell des Syrischen Goldhamsters kann mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die komplette Mikrozirkulation des freipräparierten, quergestreiften Skelettmuskels (*Musculus panniculus carnosus*) mit terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillären Venolen und Sammelvenolen sowie deren mikro-hämodynamische Parameter quantitativ analysiert werden [Endrich et al., 1980]. Die Ergebnisse der Messungen einzelner Parameter, wie zum Beispiel Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeiten, sind dabei vergleichbar mit Ergebnissen aus anderen Mikrozirkulationsmodellen [Burton und Johnson, 1972; Endrich et al., 1980].

Während der letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Modelle zur Analyse der Mikrozirkulation etabliert. Damit konnten unterschiedliche Organe und Gewebe, wie beispielsweise Muskel, Knochen, Darm, Leber, Milz, Pankreas, Herz, Lunge und Hirn [Wahl et al., 1985; Winet, 1989; Schmidt et al., 1990; Menger et al., 1992; Lehr et al., 1993; Vollmar et al., 1995; Menger et al., 1996; Vollmar et al., 1998] untersucht werden. Grundsätzlich kann man hierbei Akut-Modelle von chronischen Modellen differenzieren. Zu ersteren zählen Präparationen am Mesenterium [Zweifach, 1973], am Omentum der Katze [Intaglietta et al., 1970], am Cremastermuskel der Ratte [Prewitt und Johnson, 1976] oder an der Backentasche des Hamsters [Duling, 1973]. Man hat hierbei den Vorteil, dass die Gewebe für eine intravitalmikroskopische Untersuchung leicht zugänglich und darüber hinaus transilluminierbar sind, was die Analyse der Gefäßarchitektur und Hämodynamik erleichtert. Allerdings ist bei diesen Modellen die Untersuchung auf einen kurzen Zeitraum von wenigen Stunden begrenzt, d.h. repetitive Analysen über mehrere Tage können nicht durchgeführt werden. Des Weiteren können sowohl das chirurgische Trauma [Fiebig et al., 1991] als auch die Nar-

kose des Versuchstieres [Menger und Lehr, 1993] die Messung mikrohämodynamischer Parameter beeinflussen [Yamauchi et al., 1999].

Im Jahr 1924 konnten erstmalig chronische Untersuchungen der Mikrozirkulation an einer transparenten Kammer am Kaninchenohr durchgeführt werden [Sandison, 1924]. In den folgenden Jahren unterlag dieses Modell einer ständigen Weiterentwicklung [Reutov und Chernukh, 1977]. Primärer Nachteil dieser frühen Kammermodelle war jedoch, dass sich damit vorwiegend die Angiogenese von Granulationsgewebe im Rahmen eines Wundheilungsprozesses beobachten ließ, und somit die Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen Bedingungen nicht möglich war. Das Ziel nachfolgender Studien war es, Kammermodelle zu entwickeln, bei denen die zu untersuchenden Parameter weder durch die Implantation der Kammer noch durch das Kammermaterial selbst beeinflusst wurden [Menger et al., 2002]. Durch kontinuierliche Weiterentwicklung können solche Kammermodelle inzwischen an Ratte, Maus und Hamster durchgeführt werden [Papenfuss et al., 1979; Endrich et al., 1980; Lehr, 1993].

Heutzutage setzen sich Rückenhautkammern aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammen, die ein geringes Gewicht und eine gute Gewebeerträglichkeit aufweisen [Menger et al., 2002], wodurch die körperliche Belastung des Versuchstieres auf ein Mindestmaß reduziert wird. Weiterhin ermöglicht eine Ruhephase von 48-72 Stunden nach Implantation der Kammer eine Erholung der Tiere von der Narkose und dem chirurgischen Trauma. Durch die Möglichkeit das Deckglas der Rückenhautkammer kurzzeitig zu entfernen können die unterschiedlichsten Gewebearten in die Kammer transplantiert und deren Vaskularisierung über einen Zeitraum von 2-3 Wochen beobachtet werden. Aus diesem Grund eignet sich dieses Modell sehr gut zur Analyse der Angiogenese [Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1982; Reinhold und Endrich, 1986]. So wurde die Entwicklung neuer Blutgefäße bereits in verschiedenen transplantierten Geweben und implantierten Biomaterialien, wie zum Beispiel Tumoren [Leunig et al., 1999; Vajkoczy et al., 2000], Knochen [Funk et al., 1986], ovariellen Follikeln [Laschke et al., 2002], chirurgischen Netzen und Scaffolds [Menger et al., 1990; Kraft et al., 2000; Laschke et al., 2008a; 2009a] für das Tissue Enginee-

ring, untersucht. Der Vorteil des Rückenhautkammermodells des Hamsters gegenüber der Ratte bzw. der Maus besteht darin, dass sich die zu präparierenden Schichten, insbesondere der Retraktormuskel, leicht voneinander lösen lassen. Dies liegt daran, dass nur eine geringe intermuskuläre Gefäßversorgung besteht. Desweiteren ist das präparierte Gewebe des Hamsters deutlich transluzenter, was die Qualität der intravitalmikroskopischen Bilder verbessert.

Da die Angiogenese bei vielen pathologischen Vorgängen, wie Tumorwachstum und Metastasierung, eine wesentliche Rolle spielt, werden die der Entwicklung neuer Blutgefäße zugrundeliegenden Mechanismen intensiv erforscht [Folkman 1985; Weidner et al., 1991; Folkman, 1995]. Dabei zielen viele aktuelle Studien in der Krebstherapie darauf ab, neue anti-angiogene Behandlungsstrategien zu entwickeln [Abels et al., 1997; Zhang et al., 2000b]. Inzwischen wird die Endometriose ebenfalls den angiogenen Erkrankungen zugeordnet [Groothuis et al., 2005; May und Becker, 2008]. Diese benigne Erkrankung könnte somit ein neues Anwendungsgebiet für solche anti-angiogenen Strategien darstellen.

Für die aktuelle Studie wurde ein tierexperimentelles Endometriosemodell verwendet, bei dem die Möglichkeit besteht, die Blutgefäßneubildung in transplantiertem, ektopem Endometrium direkt zu beobachten und repetitiv zu analysieren [Laschke et al., 2005]. Bei diesem in vivo Modell induziert man Endometrioseherde durch Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters und nicht in die Bauchhöhle, wie es im konventionellen intraperitonealen Endometriosemodell der Fall ist [Laschke et al., 2007b]. Dementsprechend werden im Kammermodell immunologische Interaktionen zwischen dem ektopen endometrialen Gewebe und dem Peritoneum, wie sie bei der peritonealen Endometriose vorkommen, nicht berücksichtigt. Hinzu kommt, dass sich das physiologische Profil pro- und anti-angiogener Wachstumsfaktoren innerhalb der Rückenhautkammer vermutlich von dem der Peritonealflüssigkeit unterscheidet. Mit Hilfe des Rückenhautkammermodells ist es jedoch erstmalig möglich, wiederholt und nicht-invasiv morphologische und hämodynamische Parameter der Mikrozirkulation in Endometrioseherden über einen 2-3 wöchigen Zeitraum zu analysieren. Durch kom-

binierete Transplantation von Endometrium und ovariellen Follikeln in dieselbe Kammer besteht zudem die Möglichkeit, simultan die Angiogenese und Vaskularisierung von ovariellen Gewebe zu analysieren [Vollmar et al., 2001]. Auf diese Weise kann untersucht werden, ob bestimmte Substanzen eine anti-angiogene Wirkung ausschließlich auf Endometrioseherde ausüben, oder ob sie auch die physiologische Entwicklung neuer Blutgefäße in den weiblichen Geschlechtsorganen negativ beeinflussen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, ob die Nahrungsmittelkomponenten EGCG, Glycin und Genistein als anti-angiogene Substanzen zur Therapie der Endometriose eingesetzt werden können. Das Rückenhautkammermodell war hierfür optimal geeignet.

7.1.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

In der vorliegenden Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik angewendet, da sie eine direkte Visualisierung der Mikrozirkulation zulässt. Sie stellt somit gerade für die Analyse dynamischer Prozesse, wie die Entwicklung neuer Gefäßnetzwerke, eine ideale Untersuchungstechnik dar [Leunig et al., 1992; Menger et al., 1994; Vajkoczy et al., 2000]. Andere Verfahren, wie die Mikrosphärentechnik [Zwissler et al., 1991], die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs [Conzen et al., 1988; 1991], die Xenon-Clearance-Technik [Hendel, 1983], die photoelektrische Plethysmographie [Webster und Patterson, 1976], die Thermographie [Saumet et al., 1986], die Laser-Doppler-Flowmetrie [Chávez-Cartaya et al., 1995], Farbstofftechniken [Silverman et al., 1972] oder Techniken zur Anfertigung von Mikrokorrosionspräparaten [Forsman und McCormack, 1992], ermöglichen hingegen nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation. Damit waren sie für die vorliegenden Untersuchungen nicht geeignet.

Unter Verwendung entsprechender Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt die intravitale Fluoreszenzmikroskopie die Analyse des Fließverhaltens verschiedener Blutbestandteile, wie Thrombozyten und Leukozyten [Menger et al., 1992; Hoffmann et al., 1999; 2000]. Weiterhin lassen sich Zellschäden wie Nekrose und Apoptose [Westermann et al., 1999; Harris et al., 1997] detektieren und Veränderungen der Gefäß-

permeabilität visualisieren [Pries, 1988]. Durch die Kombination der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie mit entsprechenden Bildverarbeitungstechniken können die aufgezeichneten Bilder am Versuchsende ohne weitere Belastung des Versuchstieres quantitativ ausgewertet werden [Intaglietta und Tompkins, 1972; Pries, 1988; Klyszcz et al., 1997].

Zur Vermeidung phototoxischer Effekte auf das zu untersuchende Gewebe sollte bei Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Versuchszeit so kurz wie möglich gehalten werden. Hauptsächlich entstehen solche Effekte bei der Verwendung von Fluorochromen durch die Bildung freier Sauerstoffradikale im be-lichteten Gewebe [Povlishock et al., 1983; Penning und Dubbelman, 1994]. Mögliche Folgen sind eine Blutplättchenaktivierung mit Thrombusbildung [Rosenblum, 1978; Herrmann, 1983], Endothelzellschäden mit Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität [Povlishok et al., 1983; Reed und Miller, 1988], eine Reduktion der funktionellen Kapillardichte [Friesenecker et al., 1994] oder eine vermehrte Leukozyten-Endothelzellinteraktion [Gawlowski et al., 1989; Saetzler et al., 1997]. Zur Vermeidung der genannten phototoxischen Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit gemäß Steinbauer et al. [2000] die Beobachtungszeiten pro Versuchstier auf maximal 20-30 Minuten beschränkt und eine niedrige Dosierung des Fluoreszenzfarbstoffs 5% FITC-Dextran eingesetzt.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Epigallocatechin-3-Gallat

EGCG ist ein Ester aus Epigallocatechin und Gallussäure. Aus 3 Phenolringen bestehend gehört EGCG der Untergruppe der Polyphenole an. EGCG stellt die chemische Hauptkomponente des grünen Tees dar und macht ca. ein Drittel dessen Trockenmasse aus [Yang et al., 2006]. Der Anteil im schwarzen Tee ist weitaus geringer, da bereits die Fermentation bei der Herstellung des schwarzen Tees den Katechingehalt durch Bildung von Theaflavinen deutlich reduziert. In verschiedenen Studien wurde über die Wirkungen von EGCG berichtet. So konnten zum Beispiel Kawai et al. [2003] nachweisen, dass EGCG ähnlich wie das HI-Virus eine Bindungs-

affinität zu den CD4-Molekülen an der Oberfläche von T-Lymphozyten aufweist. Dies bewirkt, dass das Virus aufgrund der bereits durch EGCG besetzten Rezeptorstellen nicht mehr die Möglichkeit hat, an die Zellen zu binden und diese zu infizieren. Weiterhin wirkt EGCG stark antioxidativ und gilt als „Radikalfänger“ für die bei aeroben Stoffwechselfvorgängen entstehenden Sauerstoffradikale, welche an der DNA oxidative Schäden verursachen können [Nakagawa et al., 1999; Henning et al., 2005]. Schließlich wurde in verschiedenen Studien auch eine antikanzerogene Wirkung des EGCGs nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass EGCG verschiedene Mechanismen beeinflussen kann, welche eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen [Lambert et al., 2005; Ju et al., 2007]. Dazu gehören Apoptose, Mutation, Zellproliferation und Zellinvasion [Beltz et al., 2006; Khan et al., 2006].

Die Entwicklung neuer Blutgefäße spielt nicht nur bei Tumorwachstum und Metastasierung eine wichtige Rolle [Folkman, 1985; 1995], sondern ist auch eine Hauptvoraussetzung für die Entstehung und das Langzeitüberleben von Endometrioseherden [Hull et al., 2003; Nap et al., 2004; Groothuis et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass EGCG die E2-stimulierte Aktivierung, Proliferation und VEGF-Expression endometrialer Zellen hemmt und die Angiogenese und Durchblutung von Endometrioseherden reduziert. Dies führt zu einer Regression der Herde ohne dabei die Entwicklung neuer Blutgefäße in ovarialen Follikeln zu hemmen.

Für die in vitro und in vivo Experimente wurden EGCG-Dosierungen verwendet, für die bereits in verschiedenen Studien eine Wachstumshemmung von Tumoren nachgewiesen werden konnte [Chen et al., 1998; Jung et al., 2001; Fassina et al., 2004]. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass durch Trinken von grünem Tee vergleichbar hohe systemische EGCG-Konzentrationen erreicht werden. So zeigen pharmakokinetische Studien am Menschen, dass die physiologisch relevanten Serumkonzentrationen des EGCGs bei Teetrinkern ausschließlich im hohen nanomolaren Bereich liegen [Wiseman et al., 2001; Chow et al., 2003; Ullmann et al., 2003; Henning et al., 2004]. In weiteren Studien ist daher zu klären, ob der regelmäßige Konsum von grünem Tee bereits nützliche Effekte bei Patientinnen mit Endometriose

haben kann. Falls dies nicht der Fall sein sollte, könnten diese Patientinnen aufgrund jüngster Fortschritte in der stereoselektiven Herstellung von EGCG [Nagle et al., 2006] alternativ auch mit einer EGCG-Hoch-Dosis-Supplementationstherapie behandelt werden.

Der Einsatz anti-angiogen wirksamer Substanzen zur Behandlung der Endometriose wird zur Zeit als eine erfolgversprechende Therapiestrategie diskutiert [Laschke et al., 2006a; 2006b; Becker und D'Amato, 2007; Laschke et al., 2007a; 2007b]. Allerdings hat dieser Ansatz möglicherweise auch Nachteile. Ältere Endometrioseherde könnten gegenüber einer anti-angiogenen Therapie resistent sein, da sie hauptsächlich aus spärlich vaskularisiertem, fibromuskulärem Gewebe bestehen [Itoga et al., 2003]. Entsprechend ist es eher denkbar, dass anti-angiogene Wirkstoffe dazu eingesetzt werden, die Entstehung neuer Läsionen zu vermeiden. Weiterhin könnte die Applikation anti-angiogener Wirkstoffe während der postoperativen Behandlung der Endometriose dazu beitragen, das schmerzfreie Intervall für die Patientinnen zu verlängern und die Rezidivrate zu senken [Ferrero et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere ab dem Zeitpunkt der Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer mit EGCG behandelt. Aufgrund der obigen Überlegungen müssen nun weitere Studien klären, ob es auch dazu verwendet werden kann, bereits bestehende Endometrioseherde zu behandeln.

Die hemmende Wirkung des EGCGs auf die Angiogenese kann unterschiedlichen Mechanismen zugeschrieben werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass EGCG die Expression von VEGF reduziert, die Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors inhibiert, sowie die Produktion von Interleukin-8 und die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen reduziert [Cao und Cao, 1999; Tang und Meydani, 2001; Kondo et al., 2002; Lamy et al., 2002; Oak et al., 2005]. Weiterhin ist bekannt dass EGCG die Teilung und Ephrin-A1-vermittelte Migration von Endothelzellen hemmt und letztendlich den apoptotischen Zelltod in endothelialen Zellen auslöst [Yoo et al., 2002; Neuhaus et al., 2004; Tang et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde nun nachgewiesen, dass EGCG die VEGF-Expression kultivierter endometrialer Stroma- und Drüsenzellen verringert. Dies ist jedoch nur der Fall, wenn diese Zellen

zuvor mit E2 stimuliert wurden. Möglicherweise ist dies auf die Fähigkeit des EGCGs zurückzuführen, mit E2 um die Bindung an die α - und β -Östrogenrezeptoren zu konkurrieren, was bereits für menschliche Brustkrebszellen gezeigt werden konnte [Goodin et al., 2002; Farabegoli et al., 2007]. Des Weiteren berichteten Kao et al. [2000], dass eine Hochdosisbehandlung von Ratten mit EGCG das zirkulierende E2 reduziert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Endometriose eine östrogenabhängige Erkrankung ist, könnte EGCG somit eine Regression von Endometrioseherden verursachen, indem es den E2-vermittelten Signalweg in ektopem endometrialen Gewebe hemmt. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der Blutperfusion in EGCG-behandelten Hamstern stützt diese Hypothese. So konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass Endometrioseherde in bilateral ovariectomierten Hamstern im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant reduzierte Durchblutung aufweisen [Laschke et al., 2005]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit weiterhin nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit EGCG auch die VEGF-Expression in eutopem Endometrium reduziert. Da das Endometrium von Frauen mit Endometriose eine erhöhte angiogene Aktivität aufweist [Healy et al., 1998], könnte eine Behandlung mit EGCG somit nicht nur eine Regression von Endometrioseherden induzieren, sondern auch eine positive anti-angiogene Wirkung auf das eutopie Endometrium dieser Patientinnen ausüben.

Zusätzlich zur Analyse von Endometrioseherden und eutopem Endometrium wurde der Effekt von EGCG auf transplantierte ovarielle Follikel und das Ovar untersucht, um zu klären, ob auch bei anderen Organen des Reproduktionstraktes vergleichbare Effekte auslösbar sind. Ovar und Uterus sind beim Erwachsenen die einzigen Organe, in denen die Angiogenese unter physiologischen Bedingungen stattfindet, was wesentlich für eine normale reproduktive Funktion ist [Reynolds et al., 1992]. Die Behandlung der Endometriose mit anti-angiogenen Wirkstoffen hat allerdings das Risiko erhöhter Infertilität. Aus diesem Grund sollten diese Wirkstoffe selektiv die Angiogenese in Endometrioseherden hemmen. Erstaunlicherweise stellte sich in der vorliegenden Studie heraus, dass EGCG weder die Angiogenese und Durchblutung noch die Gewebeintegrität ovarieller Follikel beeinträchtigt. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Basini et al. [2005a; 2005b]. Des Weiteren

war, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Expression von PCNA und VEGF nicht vermindert. Dies könnte dafür sprechen, dass EGCG tatsächlich selektiv auf Endometriumgewebe wirkt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit EGCG zu einer Hemmung der Entwicklung von Endometrioseherden führt. Die Applikation des Polyphenols inhibierte die östrogen-induzierte Aktivierung, Proliferation und VEGF-Expression endometrialer Zellen in vitro und hemmte die Angiogenese und Durchblutung von Endometrioseherden in vivo. Aus diesem Grund stellt EGCG einen vielversprechenden therapeutischen Wirkstoff zur Behandlung der Endometriose dar, der vor allem die Entstehung neuer Herde verhindern könnte.

7.2.2. Glycin

Bei der nicht-essentiellen Aminosäure Glycin handelt es sich um die kleinste und einfachste α -Aminosäure. Im Organismus spielt sie an verschiedenen Stellen eine wesentliche Rolle. So ist Glycin als eiweißbildende Aminosäure wichtiger Proteinbestandteil, wobei sie besonders häufig in kollagenen Fasern vorkommt. Im Stoffwechsel ist sie unter anderem essentiell für die Synthese von Häm oder Thymin-Nukleotiden [Shemin et al., 1948; Falkiewicz et al., 1999]. Im zentralen Nervensystem wirkt Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter über Glycin-gesteuerte Chloridkanäle [Rajendra et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Glycin die Angiogenese und Zellproliferation in transplantiertem endometrialen und ovariellen Gewebe nicht beeinflusst, obwohl bereits mehrere Studien über die anti-angiogene Wirkung von Glycin auf Wundheilung und Tumorwachstum berichteten [Rose et al., 1999a; Amin et al., 2003]. Dies könnte darauf beruhen, dass die Angiogenese dieser Prozesse über verschiedene Mechanismen reguliert wird. Amin et al. [2003] beobachteten beispielsweise, dass die anti-angiogene Wirkung des Glycins während Wundheilung und Tumorwachstum mit einer Reduktion der Stickoxidsynthase-Expression einhergeht. Im Verlauf der Wundheilung stellen die Makrophagen den Ort der stärksten Stickoxid-

synthese-Produktion dar. Diese ist am höchsten in der Granulationsphase, in welcher sich neue Blutgefäße entwickeln [Reichner et al., 1999]. Entsprechend könnte die Inhibition der Stickoxidsynthase-Aktivität durch Glycin zu einer reduzierten Produktion und Freisetzung pro-angiogener Wachstumsfaktoren führen. Auch in der Tumorbio- logie wurde eine positive Korrelation zwischen Stickoxidproduktion und Tumor- progression beschrieben. So berichten Jadeski et al. [2000] über eine Förderung des Mammatumor-Wachstums und der Metastasierung durch Stickoxid über die Stimula- tion der Tumorangiogenese. Umgekehrt inhibiert die Blockade der Stickoxidsyn- thase durch N-nitro-L-arginin-Methyl-Ester die Entwicklung neuer Blutgefäße in die- sen Tumoren [Jadeski et al., 1999]. Zusammenfassend zeigen diese Beispiele, dass die Stickoxidsynthase ein wesentlicher Regulator der Angiogenese bei Wundheilung und Tumorwachstum sein könnte.

Im Gegensatz dazu ist die Angiogenese innerhalb der Gewebe des weibli- chen Reproduktionssystems hauptsächlich durch Sexualhormone reguliert. Östrogen stimuliert hier nachweislich die Angiogenese, indem es beispielsweise die VEGF- mRNA-Expression in Uterusgewebe hochreguliert [Shifren et al., 1996; Huang et al., 1998]. Des Weiteren spielt ovariell- es Östrogen eine essentielle Rolle bei Vasku- larisierung und Perfusion von ekto- pem endometrialen Gewebe [Laschke et al., 2005]. Da diese Art der hormongesteuerten Angiogenese nicht durch die Behandlung mit Glycin beeinflusst wird, könnte Glycin ein selektiver Inhibitor pathologischer Angio- genese in bestimmten Tumoren sein. Entsprechend konnte in der vorliegenden Ar- beit auch kein negativer Effekt auf die reproduktiven Organe von weiblichen Hams- tern und die Entwicklung ihrer Nachkommen nachgewiesen werden. Allerdings könn- ten die gewonnenen Ergebnisse speziesspezifisch sein. Aus diesem Grund sind wei- tere Studien notwendig, um zu klären, ob die hier gemachten Beobachtungen auch tatsächlich ohne Risiken auf den Menschen übertragbar sind.

Ovar und Endometrium sind charakterisiert durch zyklusabhängige Zellproli- feration und Zelltod. Bei der Apoptose handelt es sich um eine Art programmierten Zelltod. Diese kann sowohl durch äußere Einflüsse, als auch durch Prozesse inner- halb der Zelle induziert werden [Fawthrop et al., 1991; Li et al., 2006; Zhang et al.,

2010]. Die Apoptose wird aktiv von der Zelle reguliert. Eine entscheidende Rolle haben dabei Enzyme mit proteolytischer Aktivität, sogenannte Caspasen. In dieser Arbeit konnte sowohl in der Glycin- als auch in der Kontrollgruppe die Expression von gespaltener Caspase-3 und von p53 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren diese Marker des apoptotischen Zelltodes in der Gruppe der Glycin-behandelten Tiere signifikant reduziert. Jacob et al. [2003] fanden in ihrer Studie vergleichbare Ergebnisse. Sie stellten fest, dass Glycin in einem Modell zur Analyse des mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschadens in der Ratte Apoptose inhibieren kann. Zusätzlich wiesen Zhang et al. [2000a] nach, dass Glycin die Apoptose von sinusoidalen Leberendothelzellen der Ratte hemmt. Diese Inhibition ist mit einer verminderten Expression von NF- κ B assoziiert. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Transkriptionsfaktor, der in fast allen Zelltypen existiert. Durch Bindung an bestimmte Abschnitte der DNA kann er die Expression spezifischer Gene, welche Inflammation, Karzinogenese und Apoptose regulieren [Chen et al., 2001], steuern.

Bisher nahm man an, dass NF- κ B pro-apoptotisch wirkt, da er die Expression apoptotischer Gene wie FAS und FAS-Ligand stimuliert. Allerdings kam man in neueren Studien zu dem Ergebnis, dass NF- κ B auch eine anti-apoptotische Wirkung hat, abhängig von den Zell- und Gewebetypen, die analysiert wurden. Aktuell gibt es allerdings nur wenige Studien, welche die Funktion von NF- κ B in den weiblichen Reproduktionsorganen untersucht haben. Diese berichten über gegensätzliche Ergebnisse bezüglich der Wirkung von NF- κ B auf den apoptotischen Zelltod. So konnte in vitro NF- κ B die durch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induzierte Apoptose von Granulosazellen aufgrund einer vermehrten Expression der anti-apoptotischen Proteine X-Linked Inhibitor Of Apoptosis Protein und Flice-Like Inhibitory Protein hemmen [Xiao et al., 2001; 2002]. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass die durch Serumentzug induzierte Apoptose boviner Granulosazellen durch den Fas-Signalweg vermittelt wird [Quirk et al., 2000]. Das könnte die Ergebnisse einer Studie von Valdez und Turzillo [2005] erklären, in welcher der NF- κ B-Inhibitor SN50 die Apoptose in Granulosazellen ovarieller Follikel deutlich reduzierte. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und der Resultate der vorliegenden Studie ist anzunehmen, dass eine Glycin-Diät möglicherweise ovarielle und endometriale Apoptose durch Verminderung

der NF- κ B-Expression in vivo hemmt. Obwohl sich dabei die Zahl atretischer Follikel nicht reduziert, könnte dieser gewebeprotective Effekt des Glycins die Lebensfähigkeit individueller Granulosazellen verbessern. Dies könnte für fertilitätserhaltende Techniken von Vorteil sein. Hier wird ovarielles Gewebe kryokonserviert und anschließend wieder in Patientinnen transplantiert, deren gonadale Funktion durch prämatüre Menopause, Radiotherapie, Chemotherapie oder operative Kastration in Mitleidenschaft gezogen wurde [Donnez et al., 2006]. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass eine Hemmung der Apoptose auch immer das Risiko für die Entstehung von Tumoren erhöht. So spielt die Dysregulation des programmierten Zelltodes eine zentrale Rolle in der Entwicklung verschiedener Krebsarten [Meng et al., 2006]. Beispielsweise weisen Leukämiezellen in mehreren Apoptose-Wegen Veränderungen auf, was ihnen einen Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen bringt [Testa et al., 2007]. Weitere Studien sind daher noch notwendig, um zu klären, inwieweit der beobachtete anti-apoptotische Effekt von Glycin tatsächlich genutzt werden kann, um die Gewebewitalität ovariellen Gewebes positiv zu beeinflussen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Diät mit Glycin die physiologische Angiogenese und normale reproduktive Funktion in Syrischen Goldhamstern nicht negativ beeinflusst. Desweiteren führt eine Glycin-Behandlung durch Verminderung der NF- κ B-Expression zu einer Hemmung der Apoptose in endometrialem und ovariellen Gewebe. Aus diesen Gründen könnte Glycin möglicherweise zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, bei denen die pathologische Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, ohne ernsthafte Nebeneffekte innerhalb des weiblichen Reproduktionstraktes zu induzieren. Zukünftige Studien müssen klären, ob der beobachtete anti-apoptotische Effekt von Glycin den Gewebeschaden während ovarieller Kryokonservierung und Transplantation reduzieren kann, was die Erfolgsraten bei modernen Fertilitätserhaltungstechniken erhöhen würde.

7.2.3. Genistein

Genistein gehört der Gruppe der Isoflavone an und kommt in zahlreichen Pflanzen, aber auch in Sojabohnen vor. Neben den anti-oxidativen Eigenschaften von Ge-

nistein konnte auch eine Affinität dieses Isoflavons zu den α - und β -Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden [Mathieson und Kitts, 1980; Kuiper et al., 1998], was zur Aktivierung der klassischen Östrogen-Rezeptor-Kaskade führt. Zurückzuführen ist dies auf die strukturelle Ähnlichkeit des Genisteins zu 17- β -Östradiol, womit die beobachteten utertropen Effekte bei Tieren erklärt werden können [Folman and Pope, 1966].

In der vorliegenden Arbeit konnte die Behandlung mit Genistein die Vaskularisierung und Mikrohämodynamik in Endometrioseherden und ovariellen Follikeln nicht beeinflussen. Dies ist überraschend, da in der Vergangenheit die Applikation von vergleichbaren (50mg/kg) oder sogar geringeren Dosen zu einer effektiven Hemmung der Entwicklung neuer Blutgefäße in zahlreichen Tumoren führte [Büchler et al., 2004, Gu et al., 2005; Farina et al., 2006]. Vermutlich wird dieser anti-angiogene Effekt durch eine Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Faktors-1 α (HIF-1 α) vermittelt [Büchler et al., 2004]. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die VEGF-Genexpression unter hypoxischen Bedingungen stimuliert. In ektopem endometrialen Gewebe ist keine eigene Blutversorgung vorhanden. Folglich ist die HIF-1 α induzierte VEGF-Freisetzung auch bei der Entwicklung neuer Blutgefäße innerhalb von Endometrioseherden von besonderer Bedeutung [Becker et al., 2008]. Allerdings sind neben VEGF verschiedene andere angiogene Faktoren an der Pathogenese der Endometriose beteiligt, wie zum Beispiel FGF [Di Blasio et al., 1995], PDGF [Surrey and Halme, 1991], Haptoglobin [Piva et al., 2001], die MMPs 2 und 9 [Ria et al., 2002] sowie Cyr61 [Absenger et al., 2004]. Daher könnte der inhibitorische Effekt von Genistein auf die VEGF-Expression in den vorliegenden Experimenten durch die hohe Aktivität anderer angiogener Faktoren überlagert werden. Entsprechend konnte in einer früheren Studie am Rückenhautkammermodell die Angiogenese von Endometrioseherden nur bei kombinierter Blockade von VEGF, FGF und PDGF gehemmt werden, nicht aber bei alleiniger Inhibition von VEGF [Laschke et al., 2006a].

In einer Studie von Nap et al. [2003] führte die Transplantation von Endometriumfragmenten in die Bauchhöhle zur Ausbildung von Endometrioseherden. Dies war jedoch nicht der Fall, wenn einzelne endometriale Zellen transplantiert wur-

den. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine erhaltene Gewebintegrität für die ektope Implantation von Endometrium notwendig ist. Dabei ist es möglich, dass die Blutgefäße, welche bereits innerhalb der Endometriumfragmente enthalten sind, Verbindungen zu den Gefäßen des Peritoneums ausbilden, was zu einer kompletten Vaskularisierung der sich entwickelnden Endometrioseherde innerhalb kurzer Zeit führen könnte. Dieser Prozess, welcher als Inoskulation bezeichnet wird [Laschke et al., 2009b], benötigt eine viel geringere Konzentration pro-angiogener Wachstumsfaktoren als die Entwicklung ganzer mikrovaskulärer Netzwerke innerhalb der Endometrioseherde. Im Falle der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit würde dies bedeuten, dass Endometrioseherde dazu fähig sind, eine ausreichende Vaskularisierung über Inoskulation zu erzielen, auch wenn die Behandlung mit Genistein möglicherweise die Gesamtkonzentration pro-angiogener Wachstumsfaktoren in den Transplantaten verringert. Diese Interpretation wird dadurch gestützt, dass Genistein-behandelte Herde und Kontrollherde bereits am 4. Tag eine hohe funktionelle Kapillardichte von $\sim 300\text{cm}/\text{cm}^2$ aufwiesen, welche bis zum Ende des Experimentes nicht weiter anstieg.

In einem intraperitonealen Endometriosemodell konnten Yavuz et al. [2007] kürzlich zeigen, dass Genistein zu einer Regression von Endometrioseherden in Ratten führte. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit und den Resultaten von Cotroneo und Lamartiniere [2001]. In deren Studie förderte Genistein sogar das Wachstum von Endometrioseherden. Allerdings war dies nur in ovar-ektomierten Tieren der Fall. Weiterhin hemmten nur subkutane Genistein-Injektionen, nicht aber diätätisch zugeführtes Genistein das Wachstum der Herde. Daneben zeigten die Untersuchungen von Foth und Cline [1998], dass Isoflavone nur dann einen antiproliferativen Effekt auf das Endometrium postmenopausaler Makaken haben, wenn sie simultan mit exogenem Östradiol gegeben werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Wirkung wesentlich vom hormonellen Zustand der behandelten Individuen, der Dosis und dem Applikationsweg abhängt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu der Dosis von 50mg/kg KG Genistein, bei welcher bereits eine Hemmung der Tumorangiogenese nachgewiesen werden konnte [Gu et al., 2005], eine höhere Dosis von 200mg/kg KG ge-

testet. Obwohl diese Dosis die Vaskularisierung der Endometrioseherde verzögerte, wiesen die Herde am 14. Tag keine signifikant reduzierte funktionelle Kapillardichte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Es ist daher möglich, dass Genistein den angiogenen Prozess während der initialen Entwicklung der Endometrioseherde verzögert. Dies ist jedoch nur bei hohen Genistein-Dosen der Fall und führt nicht zu einer verschlechterten Vaskularisierung der Herde im weiteren Verlauf.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Genistein die Vaskularisierung von Endometrioseherden im Rückenhautkammermodell nicht wesentlich beeinflusst. Weiterhin wird die Blutgefäßentwicklung in ovarialen Follikeln unter Genistein-Behandlung ebenfalls nicht gehemmt. Aus diesem Grund könnte Genistein als selektiver Inhibitor der pathologischen Angiogenese zur Therapie bestimmter Tumorarten eingesetzt werden, ohne die Blutgefäßentwicklung in den weiblichen Reproduktionsorganen negativ zu beeinflussen. Dies wäre allerdings gegebenenfalls mit Nebenwirkungen bei jungen Krebs-Patientinnen verbunden, da gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit Genistein verschiedene negative Auswirkungen auf die ovarielle Funktion, den Östrogen-Zyklus und die Fertilität haben kann [Jefferson et al., 2007].

7.2.4. Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden erstmalig im Rückenhautkammermodell des Syrischen Goldhamsters Endometriumfragmente und ovariale Follikel simultan analysiert. Dies ermöglichte es, die Angiogenese in sich entwickelnden Endometrioseherden und ovarialen Follikeln gleichzeitig zu beobachten und quantitativ zu analysieren.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit EGCG zukünftig eine erfolgversprechende Therapieoption für Patientinnen mit Endometriose sein könnte, da es der Bildung neuer Herde vorbeugt, ohne dabei die Entwicklung neuer Blutgefäße im ovarialen Gewebe zu beeinflussen. Glycin und Genistein sind möglicherweise als selektive Inhibitoren der Angiogenese bestimmter Tumoren einsetzbar, ohne Nebenwirkungen innerhalb des weiblichen Reproduktionstraktes zu verursachen. Au-

ßerdem könnte Glycin bei fertilitätserhaltenden Techniken von Vorteil sein, bei denen ovarielles Gewebe kryokonserviert und in Patientinnen transplantiert wird, deren gonadale Funktion durch Erkrankungen, Radio- oder Chemotherapie beeinträchtigt wurde.

Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass das Rückenhautkammermodell hervorragend dazu geeignet ist, Substanzen auf ihre anti-angiogene Wirkung in Bezug auf Endometrioseherde und ovarielles Gewebe zu analysieren. Dabei liefern die hier gewonnenen Ergebnisse bereits wichtige Ansatzpunkte für weitere Studien.