

2 Literaturübersicht

2.1 Das Ovar des Rindes

2.1.1 Mikroskopische Anatomie

Den äußeren Abschluss der Ovarien bildet das Epithelium superficiale, ein isoprismatisches, bei älteren Tieren abgeflachtes, einschichtiges Deckepithel. Die dem Epithelium superficiale unterlagerte, gefäßarme Tunica albuginea ist mit dem Stroma der Zona parenchymatosa verbunden. Die Zona parenchymatosa ist von einem Kapillarnetz durchsetzt, das die Keimzellen während ihrer Reifung versorgt. Sie schließt Ovarialfollikel und Corpora lutea verschiedener Entwicklungs- und Rückbildungsstadien ein (LIEBICH, 2004). Die innerste Zone, die Zona vasculosa, enthält ein Netzwerk bestehend aus lockerem Bindegewebe und elastischen Fasern, in dem stark gewundene Arterien und Venen verlaufen, die untereinander anastomosieren (PLENDL, 2000).

2.1.2 Blutgefäßversorgung

Die arterielle Blutversorgung des Ovars wird von der aus der Aorta abdominalis abzweigenden Arteria ovarica gewährleistet. In Hilusnähe teilt sich die Arteria ovarica in viele, mäanderförmig verlaufende Äste, die am Gekröseansatz in die Zona vasculosa des Ovars eintreten. Venöses Blut wird über die Vena ovarica sinistra und die Vena ovarica dextra, die dicht an der Arteria ovarica gewunden im Mesovarium verlaufen, in die Vena iliaca communis und die Vena cava caudalis abgeführt (NICKEL et al., 2004).

2.1.3 Ovarieller Zyklus

Der Zyklus des Rindes dauert durchschnittlich 21 Tage (18-24 Tage). Unter dem endokrinen Einfluss des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH) der Adenohypophyse wächst im Proöstrus (Dauer 2-3 Tage) ein Follikel heran. Im Östrus (Dauer 12-40 Stunden) reift der Follikel aus. Im Anschluss an die Ovulation vollzieht sich im Metöstrus (Dauer 2-3 Tage) der Umbau des Corpus hämorrhagicum zum Corpus luteum. Im Diöstrus (Dauer 14 Tage) wird das Corpus luteum unter dem Einfluss von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) zurückgebildet (LIEBICH, 2004).

2.1.4 Ovarialfollikel

Aufgrund der Größe und des Entwicklungsgrades lassen sich vier Follikelpopulationen unterscheiden: Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel (LIEBICH, 2004).

Die subkapsulär liegenden Primordialfollikel sind im Durchmesser 30 µm groß und bestehen aus der Oozyte und einer Schicht aus undifferenziertem Follikelepithel.

Primärfollikel erreichen Durchmesser von 40 bis 60 µm. Ihr einschichtiges Follikelepithel wird iso- bis hochprismatisch.

Sekundärfollikel sind im Durchmesser 150 bis 300 µm groß (JIANG et al., 2002). Zwischen der Eizelle und dem beim Wiederkäuer bis zu zehn Schichten umfassenden Follikelepithel setzt die Ausbildung der Zona pellucida ein. Die Zona pellucida besteht aus Glykoproteinen und Wachstumsfaktoren wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (CELIK-OZENCI et al., 2003). An das Follikelepithel angrenzendes Rindenstroma differenziert sich zur gefäßreichen Theca folliculi.

Tertiärfollikel sind durch flüssigkeitsgefüllte Spalträume im mehrschichtigen Follikelepithel gekennzeichnet, die sich zu einer Follikelhöhle vereinigen (ZIMMERMANN et al., 2003). Das die Follikelhöhle begrenzende mehrschichtige Follikelepithel enthält exzentrisch im Cumulus oophorus die Eizelle. Der Eizelle unmittelbar anliegende Cumuluszellen bilden die Corona radiata. Die vom Follikelepithel durch eine Basalmembran getrennte Theca folliculi differenziert sich in die Theca interna und Theca externa. Der sprungreife Tertiärfollikel dehnt sich präovulatorisch über die Ovaroberfläche (Graaf-Follikel) aus. Die Follikelepithelzellen des Graaf-Follikels werden auch als Granulosazellen bezeichnet (LIEBICH, 2004).

2.1.5 Follikulogenese

RAJAMAHENDRAN und TAYLOR beobachteten schon 1988, dass sich innerhalb eines Zyklus zwei bis drei Follikelwellen an bilden. Bei Zwei-Wellen-Zyklen beginnt die Ausbildung der Follikel am Tag der Ovulation und am zehnten Tag post ovulationem. Bei Drei-Wellen-Zyklen beginnt die Reifung der Follikel am Tag der Ovulation sowie am neunten und sechzehnten Tag post ovulationem. Am Ende jeder Follikelwelle steht ein dominanter Follikel.

Von der Hirnrinde, dem limbischen System, dem Thalamus, dem retikulären aufsteigenden System und dem Rückenmark erhält der Hypothalamus Informationen, die er über neurosekretorische Zellen an die Hypophyse weitergibt. Die Hypophyse reagiert mit der Ausschüttung von Gonadotropin Releasing Hormon, das die Freisetzung der Gonadotropine -

Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) - ins Blut bewirkt (LÖFFLER und PETRIDES, 1997).

Follikel mit mehreren Granulosazellschichten reagieren bereits auf einen geringen FSH-Anstieg im Serum mit einer verstärkten Expression von FSH-Rezeptoren an der Plasmamembran der Granulosazellen. Das FSH/FSH-Rezeptorsystem induziert die Proliferation von Granulosazellen (ABEL et al., 2000). WEBB et al. (2003) fanden, dass FSH gemeinsam mit lokal produzierten Wachstumsfaktoren wie z.B. Transforming Growth Factor β , die Wachstumsrate präovulatorischer Follikel steigert. Untersuchungen kultivierter Follikel der Ratte zeigen, dass die Inkubation mit FSH die Rate apoptotischer Zellen um 75-80% reduziert (PARBORELLI et al., 2001). Ausschlaggebend für die ausreichende Bereitstellung von FSH ist die Intensität der thecalen Angiogenese. Die vorrangige Versorgung einzelner Follikel mit Gonadotropinen über das vaskuläre System ist von entscheidender Bedeutung für die Selektion und das Wachstum eines dominanten Follikels (WULFF et al., 2001 b). Als Schlüsselfaktor der thecalen Angiogenese gilt VEGF. WULFF et al. (2002) beobachteten, dass die Injektion eines gegen VEGF gerichteten Antikörpers, VEGF_{trap} R1R2, die Proliferation von Endothelzellen in der Theca folliculi signifikant reduziert.

FSH stimuliert die Synthese von Androgenbindenden Proteinen und Inhibin in den Granulosazellen. In Zellen der Theca interna unter LH-Einfluss gebildete Androgene diffundieren in Granulosazellen, wo sie durch den unter FSH-Einfluss verstärkt synthetisierten 19-Hydroxylase-Aromatasekomplex zu Östradiol-17-beta aromatisiert werden (TROUNSON und GARDNER, 1993; LÖFFLER und PETRIDES, 1997). Östradiol reguliert die hypophysäre Gonadotropinsekretion über eine Änderung der Amplitude oder der Häufigkeit der Freisetzung von LH-Releasing Hormon aus dem Hypothalamus. Im Gegensatz zu seiner Wirkung auf die LH-Sekretion hemmt Östradiol die Ausschüttung von FSH (VAN AARLE et al., 1999).

2.1.6 Ovulation

Der LH-Peak leitet die Ovulation ein. LH stimuliert die Synthese von VEGF in Granulosazellen (SUGINO et al., 2000; DUFFY und STOUFFER, 2003). Der vormals als Vascular Permeability Factor beschriebene VEGF bedingt Vasodilatation und erhöhte vaskuläre Permeabilität. Durch infolge der erhöhten vaskulären Permeabilität in das Interstitium ausströmende Flüssigkeit und Makromoleküle entsteht ein Gewebeödem (BATES und HARPER, 2002). Das Gewebeödem komprimiert die den Follikel versorgenden Blutgefäße. Die daraus resultierende Minderperfusion wird durch Endothelin-1 (ET-1), einen der potentesten

Vasokonstriktoren, verstärkt. ET-1 wird unter Einfluss von LH aus Zellen der Theca folliculi freigesetzt und bindet an Endothelin-Rezeptoren auf Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen (ACOSTA et al., 1998). Die Minderperfusion führt unter Beteiligung proteolytischer Enzyme wie z.B. Plasmin und Metalloproteinasen, zur Ruptur der Follikelwand (DOW et al., 2002; DUFFY und STOUFFER, 2003). Die proenzymatische Form der Metalloproteinasen wird von Plasmin aktiviert (MAKOWSKI und RAMSBY, 1998; MURPHY et al., 1999). Plasmin ist die durch tPA (tissue plasminogen activator) und uPA (urokinase plasminogen activator) aktivierte Form des im Blut und Gewebe vorkommenden Plasminogens. Plasmin führt in Verbindung mit Metalloproteinasen zur Degradation von Fibrin, Fibrinogen, Kollagen vom Typ III und IV, Fibronectin, Laminin und Proteoglykanen (DOW et al., 2002). Untersuchungen von COLGIN und MURDOCH (1997) am Schaf ergaben, dass die Applikation eines gegen uPA gerichteten Antikörpers die Ovulationsrate signifikant reduziert. DOW et al. (2002) beobachteten einen Anstieg der tPA-, uPA- und der uPRA- (Rezeptor für uPA)-mRNA in bovinen präovulatorischen Follikeln.

2.1.7 Der Gelbkörper

Durch die mit Blutkoagula, Blutserum und Follikelflüssigkeit angefüllte ursprüngliche Follikelhöhle wird der frühe, im Durchmesser 0,5 bis 0,6 cm große, Gelbkörper bis zu drei Tagen nach der Ovulation als Corpus hämorrhagicum bezeichnet (MODLICH, 1997; NICKEL et al., 2004). Von der Theca interna aus durchdringen kleinste Kapillaren mit einer noch durchlässigen Gefäßwandung die Granulosazelllage und sprossen in Richtung des Zentrums des sich anbildenden Gelbkörpers (MODLICH, 1997). Mit den einsprossenden Kapillaren gelangen Makrophagen, Fibroblasten, Granulosazellen und Zellen der Theca folliculi in die ehemalige Follikelhöhle (LIEBICH, 2004). Aufgrund der hellroten Gefäßsprosse im Zentrum der Einfaltungen und im Bereich der Thecazelllage wird der im Durchmesser 1,2 bis 1,5 cm große Gelbkörper vier bis sieben Tage post ovulationem als Corpus rubrum beschrieben (LIEBICH, 2004; NICKEL et al., 2004). Nach Abschluss der Anbildungsphase ist die zentrale Blutung vollständig organisiert (MODLICH, 1997). Durch intrazytoplasmatische Einlagerung von Lipochromen (LIEBICH, 2004) luteinisieren Granulosazellen und Zellen der Theca folliculi zu Granulosa- und Thecaluteinzellen (MAYBIN und DUNCAN, 2004). Der im Durchmesser 1,9 bis 3 cm große Blütegelbkörper ist goldgelb gefärbt (NICKEL et al., 2004). Mittels Serienanalyse der Genexpression von Luteinzellen fanden MCRAE et al. (2005), dass Luteinzellen unter anderem Gene für folgende Proteine exprimieren: Syndecan-1, Vanin-1 und Spp-1. Syndecan-1 ist ein heparinbindendes Membranproteoglykan, das als Corezeptor

für Wachstumsfaktoren fungiert (BELLIN et al., 2002). Das Zelloberflächenmolekül Vanin-1 steuert möglicherweise im Corpus luteum die Migration lutealer und endothelialer Zellen (MCRAE et al., 2005). Spp-1 stimuliert die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen (MAZZALI et al., 2002).

Die wohl bedeutendste funktionale Veränderung im Rahmen der Luteinisierung ist der Anstieg der Progesteronsynthese, wie der Anstieg des Progesterongehaltes im Serum zeigt (MCRAE et al., 2005). Die Synthese von Progesteron obliegt in erster Linie den Granulosaluteinzellen. In vitro produzieren ovine Granulosaluteinzellen über eine Dauer von sieben Tagen elfmal mehr Progesteron (528 +/- 137 ng/ml) als Thecaluteinzellen (48 +/- 17 ng/ml) (GRAZUL-BILSKA et al., 1991). Möglicherweise stammt demgegenüber der unter LH-Einfluss von Luteinzellen synthetisierte VEGF vorwiegend von den Thecaluteinzellen. Diese Hypothese stützen Untersuchungen humaner Corpora lutea, die ergaben, dass die Anzahl von Thecaluteinzellen im Corpus luteum in Anbildung deutlich größer ist als im Corpus luteum in Blüte (LEI et al., 1991). GRAZUL-BILSKA et al. (1991) beobachteten, dass von ovinen Thecaluteinzellen konditioniertes Zellkulturmedium die Proliferation boviner Endothelzellen aus der Aorta unabhängig davon stimuliert, von welchem Tag der Kultur das Medium stammt. Demgegenüber stimuliert von ovinen Granulosaluteinzellen konditioniertes Zellkulturmedium die Endothelzellproliferation nur, wenn es vom 7. Tag der Kultur stammt. Das über Arachidonsäure (HANSEL, 1996), essentielle Fettsäuren und Vorstufen aller Prostaglandine (SMITH und DEWITT, 1996) verfügende luteale Gewebe besitzt die Fähigkeit zur Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) und PGF_{2α} (FOWKES et al., 2001). PGE₂ besitzt luteoprotektive Eigenschaften wie eine positive Korrelation zwischen lutealem PGE₂ und der Progesteronkonzentration belegen (KOTWICA et al., 2003).

Unter dem hormonellen Einfluss von PGF_{2α} setzt die Rückbildung des Corpus luteum ein (AROSH et al., 2004). MODLICH (1997) unterschied vier Stadien der Gelbkörperrückbildung: den im Durchmesser 2 bis 1,4 cm großen frühen Regressionsgelbkörper, den im Durchmesser 1,4 bis 1,2 cm großen späten Regressionsgelbkörper, den im Durchmesser 1 bis 0,5 cm großen frühen Residualgelbkörper und den im Durchmesser weniger als 0,5 cm großen späten Residualgelbkörper. Der frühe Regressionsgelbkörper ist durch die beginnende Auflösung der Luteinzellen gekennzeichnet. Im späten Regressionsgelbkörper befinden sich die Luteinzellen weitgehend in Auflösung. Die Gefäße zeigen ein arterioläres Aussehen. Im frühen Residualgelbkörper sind die arteriolären Gefäße eng zusammengedrückt. Im späten Residualgelbkörper ist das Gefäßlumen der eng beieinander liegenden Gefäße fast immer verschlossen. Zwischen den Gefäßen befindet sich jetzt Bindegewebe (MODLICH, 1997).

Während sich mit Beginn der Luteolyse die Anzahl der Kapillaren durch vaskuläre Regression verringert, steigt die arterioläre Dichte zwischen den zugrunde gehenden Luteinzellen. Spätere Rückbildungsstadien des Corpus luteum, wie der frühe und späte Residualgelbkörper, sind durch in elastisches Bindegewebe eingebettete Inseln arteriolärer Gefäße mit zwei bis drei Lagen vaskulärer glatter Muskelzellen gekennzeichnet. Die Gefäßwände arteriolärer Gefäße des Corpus luteum in Anbildung und Blüte bestehen aus einer Lage vaskulärer glatter Muskelzellen. Durch Proliferation entwickelt sich eine aus mehreren Lagen vaskulärer glatter Muskelzellen bestehende Gefäßwand, wie immunhistochemische Untersuchungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 zeigen. Zu Beginn der Luteolyse verringert sich die Proliferationsrate der Myozyten um 26%. In späten Rückbildungsstadien können keine proliferierenden vaskulären glatten Muskelzellen dargestellt werden. Die in späten Rückbildungsstadien zu beobachtende Verdickung der Media entsteht vielmehr durch die Formation von Kollagen und elastischen Fasern (BAUER et al., 2003). Die Zunahme interstitiellen Bindegewebes in späten Gelbkörperstadien ist auf die Transformation thecaler Zellen zu Bindegewebszellen unter Einfluss von Insulin und Epidermal Growth Factor zurückzuführen. Anhand immunhistochemischer Untersuchungen konnten Insulinrezeptoren (YEN et al., 2004), Epidermal Growth Factor und Epidermal Growth Factor Receptor (SHIMIZU et al., 2002) in Thecazellen atretischer Follikel und Bindegewebszellen humaner (YEN et al., 2004) und boviner (SHIMIZU et al., 2002) Corpora albicantia dargestellt werden. Die während der Luteolyse zugrunde gegangenen Endothel- und Luteinzellen werden von Makrophagen aufgenommen. $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimuliert die Expression von Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)-mRNA in lutealen Endothelzellen. MCP-1 induziert die Einwanderung aktivierter Makrophagen in das sich zurückbildende Corpus luteum (OHTANI et al., 1998). Am 21. Tag post ovulationem hat sich der Durchmesser des Regressionsgelbkörpers gegenüber dem Corpus luteum in Blüte auf die Hälfte verringert. Am Ende des folgenden Zyklus, etwa um den 40. Tag, hat sich der Durchmesser erneut halbiert (KÖNIG und AMSELGRUBER, 1987). Kennzeichnend für die Luteolyse ist, dass sich die Gewebeinvolution ohne Anzeichen einer Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe vollzieht (ACOSTA et al., 2002). Stickoxid (NO) induziert die bei akuten Entzündungen und Ödemen auftretende Vasodilatation. ACOSTA et al. (2002) beobachteten zwei Stunden nach Einsetzen der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Luteolyse einen Anstieg des Blutflusses im Corpus luteum, der möglicherweise auf die Freisetzung von NO zurückzuführen ist. Gleichzeitig erreicht die Konzentration von Interleukin-1 β (IL-1 β) das Maximum. IL-1 β stimuliert die Produktion von Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2, der wiederum die Synthese von NO hemmt (IKEGAMI

et al., 2002). Infolgedessen verringert sich im weiteren Verlauf der Luteolyse der Blutfluss (NEUVIANS et al., 2004).

2.2 Luteale Angiogenese

Im Zeitraum der ersten acht Zyklustage post ovulationem vergrößert sich das im Durchmesser 0,5 bis 0,6 cm große Corpus luteum auf 1,9 bis 3 cm. Die Tatsache, dass jedes Gewebewachstum über einen Durchmesser von einem halben Millimeter Blutgefäßwachstum erfordert, veranschaulicht, dass das Wachstum des Corpus luteum von einer intensiven Angiogenese begleitet sein muss (AUGUSTIN, 2000). Das sich bildende Corpus luteum gehört zu den am stärksten vaskularisierten Geweben des Organismus (REYNOLDS und REDMER, 1999). Die intensive Vaskularisierung ist essentiell für die Versorgung hormonproduzierender Zellen im Ovar mit Sauerstoff, Nährstoffen, Hormonvorstufen und exogenem Cholesterin für die Steroidgenese (DENSCHLAG und KECK, 2002).

2.2.1 Zelluläre und molekulare Mechanismen der lutealen Angiogenese

Den Ausgangspunkt für die luteale Angiogenese bildet das Gefäßnetz des rupturierten Follikels (SUZUKI et al., 1998). Kollagenasen, wie z.B. Metalloproteinase-2, -9, die als Reaktion auf einen angiogenen Stimulus von Endothelzellen freigesetzt werden, führen zur Degradation der Basalmembran (MURDOCH und GOTTSCHE, 2003) zwischen der Granulosazellschicht und der Theca folliculi. Thecale Gefäße gelangen in die vormals avaskuläre Granulosazellschicht (AUST et al., 1999). Die Endothelzellen bilden Pseudopodien aus und dringen durch die durchlässig gewordene Basalmembran in die Extrazellulärmatrix vor (HAZZARD und STOUFFER, 2000). Die Verlängerung des entstandenen Endothelzellsprosses erfolgt durch Proliferation endothelialer Zellen an dessen Basis. Gegen Ende der frühen lutealen Angiogenese durchzieht ein weitmaschiges Kapillarnetz mit einer durchschnittlichen interkapillären Distanz von 100 µm das sich entwickelnde Corpus luteum. Die maximale Gefäßdichte wird um den neunten Zyklustag post ovulationem erreicht, wobei die Maschenweite des Kapillarnetzes mit 40 bis 60 µm der Größe der Luteinzellen entspricht (OTTANDER et al., 2004). Jede Luteinzelle steht in Kontakt mit zwei bis vier Kapillaren (GOEDE et al., 1998).

2.2.2 Angiogene Faktoren im Ovar

Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Endothelzellen, ist ein komplexer Vorgang, der durch stimulierende und inhibierende Faktoren reguliert wird (PLENDL, 2000). Im Organismus kommen angiogene und anti-angiogene Faktoren nebeneinander vor (GREENAWAY et al., 2004). Ist das Gleichgewicht zugunsten angiogener Faktoren verschoben, wird die Angiogenese induziert (HANAHAN und FOLKMAN, 1996).

Im Ovar wurde eine Vielzahl angiogener Faktoren identifiziert (DUNCAN, 2000).

Zu den wichtigsten zählen solche aus der Gruppe der VEGF und Fibroblast Growth Factors (FGF). Im Vergleich zu VEGFs verfügen FGFs *in vitro* über eine deutlich höhere proangiogene Aktivität. Die höchste proangiogene Aktivität *in vitro* wird durch die kombinierte Anwendung von VEGF und FGF erreicht (BERISHA et al., 2000, BAHRAMSOLTANI, 2003).

Als wichtige Modulatoren der Angiogenese im Ovar gelten Ang-1 und -2 (WULFF et al., 2000; JIANG et al., 2003). Die biologischen Aktivitäten von Ang-1 und Ang-2 werden von Tie-2/Tek, einem zur Familie der Tyrosinkinase gehörenden Rezeptor, vermittelt. Tie-2/Tek ist auf Zellen der Theca interna, Perizyten, vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen lokalisiert (HATA et al., 2002). Tie-1, ein endothelzellspezifischer Tyrosinkinase-Rezeptor wird verstärkt während der Wundheilung, der ovariellen Follikelreifung und der tumoralen Angiogenese exprimiert (KAIPAINEN et al., 1994). SAHARINEN et al. (2005) zeigten, dass Ang-1 und Ang-4 den auf Endothelzellen lokalisierten Tie-1 durch Phosphorylierung aktivieren. Im Gegensatz zu dem angiogenen Faktor Ang-1 verfügt Ang-2 sowohl über angiogene als auch anti-angiogene Eigenschaften. Im angiogenen Milieu der frühen lutealen Phase in Anwesenheit von VEGF wirkt Ang-2 angiogen (Abb. 1).

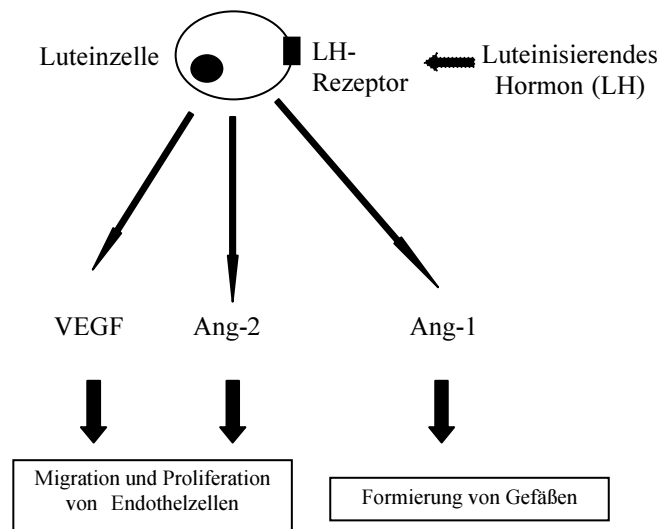


Abb. 1: Mechanismen der Steuerung der Angiogenese im Ovar

Von Luteinzellen im Verlauf der Gelbkörperentwicklung freigesetzter VEGF bewirkt einen Anstieg der Ang-2-Konzentration (WULFF ET AL., 2000), so dass sich der Quotient Ang-2/Ang-1 von 1.34 im Corpus luteum in Anbildung auf 7.59 im sich zurückbildenden Corpus luteum vergrößert (GOEDE et al., 1998). In hoher Konzentration verdrängt Ang-2 als kompetitiver Antagonist Ang-1 vom gemeinsamen Rezeptor ohne ein Signal auszulösen und blockiert die angiogenen Effekte von Ang-1 (Abb. 2).

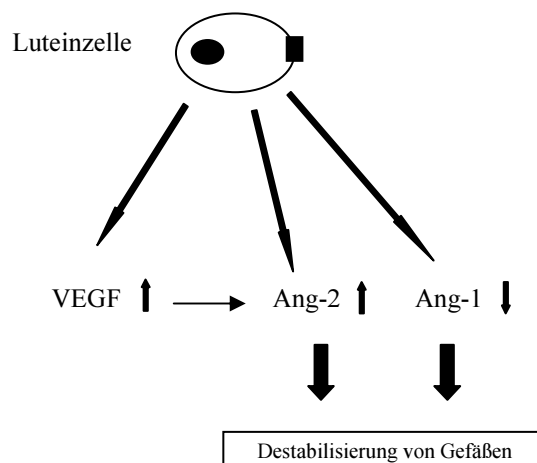


Abb. 2: Mechanismen der Steuerung der Anti-Angiogenese im Ovar

2.2.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) im Ovar

Als wichtigster proangiogener Faktor im Ovar gilt derzeit der vormals als Vascular Permeability Factor bezeichnete Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Der von Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen gebildete VEGF erhöht die vaskuläre Permeabilität und fördert die Proliferation und Migration von Endothelzellen (FRASER et al., 2000; SUGINO et al., 2000; DENSCHLAG und KECK, 2002). Die VEGF-Familie besteht aus sechs Mitgliedern. Diese sind neben dem auch als VEGF-A bezeichneten VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und Placenta Growth Factor (SUHURDJA und HOFFMANN, 2003). VEGF kommt aufgrund alternativen Spleißens von acht Exons in fünf Isoformen vor. Dabei handelt es sich um VEGF₂₀₆, VEGF₁₈₉, VEGF₁₆₅, VEGF₁₄₅ und VEGF₁₂₁ (POLTORAK et al., 1997; ENOMOTO et al., 2003). Untersuchungen von VEGF-Transkripten mittels RT-PCR ergaben, dass Gelbkörpergewebe in erster Linie die Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ exprimiert (BERISHA et al., 2000). Ein weiteres Mitogen im Ovar ist der Endocrine gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF). Das selektiv angiogene Mitogen EG-VEGF wird z.B. von Luteinzellen freigesetzt, wie Untersuchungen am Ovar des Menschen, der Ratte und des Rindes ergaben (KISLIOUK et al., 2005).

Im Ovar verstärkt freigesetzter VEGF gilt als Auslöser des humanen ovariellen Hyperstimulationssyndroms (OHSS). Das OHSS, eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung, entsteht nach der Behandlung mit Gonadotropinen zur Induktion der Follikelreifung und Ovulation. Der pathogenetisch wichtigste Faktor in der Entstehung eines OHSS ist die erhöhte Gefäßpermeabilität, hervorgerufen durch die verstärkte Sekretion von VEGF durch Granulosazellen. Die vermehrte Gefäßpermeabilität führt zu einer Abnahme des intravaskulären Volumens mit Hypoalbuminämie und erhöhter Blutviskosität. Aus letzterer resultieren erhöhte Thrombosegefahr und verminderte renale Perfusion, die zum Nierenversagen führen kann. Durch Extravasation von Proteinen bildet sich Aszites, in besonders schweren Fällen auch ein Hydrothorax und Anasarca (WANG et al., 2002; GOMEZ et al., 2002; 2003).

Untersuchungen an Ratten zeigten, dass die Injektion von humanem Choriongonadotropin (hCG) zu einer verstärkten Sekretion von VEGF führt. GOMEZ et al. (2002; 2003) beobachteten 48 Stunden nach der Injektion von hCG einen signifikanten Anstieg der VEGF-mRNA-Expression gegenüber der Kontrollgruppe. Der Grad der vaskulären Permeabilität, gemessen anhand der 30 min nach venöser Injektion in der Peritonealflüssigkeit vorhandenen Farbstoffmenge, stieg von 9.81 pro 100 g Körpergewicht (zwei Stunden nach Injektion von

hCG) auf 26.1 µg pro 100 g Körpergewicht (48 Stunden nach Injektion von hCG) (GOMEZ et al., 2002).

Die mitogene und vasoaktive Aktivität von VEGF im Ovar werden von zwei zur Familie der Tyrosinkinase gehörenden Rezeptoren, Flt-1 (fms-like-tyrosine kinase) oder VEGF-R1 und Flk-1/KDR (fetal liver kinase-1/KDR) oder VEGF-R2, vermittelt (BERISHA et al., 2000; GEVA und JAFFE, 2000; VEIKKOLA et al., 2000).

2.2.2.1.1 VEGF im Follikel

EINSPANIER et al. (2002) stellten VEGF an Gefrierschnitten boviner Follikel mittels Immunhistochemie in Zellen des Cumulus-Oozyten-Komplexes dar. Mittels RT-PCR gelang außerdem der Nachweis von VEGF, Flt-1 und Flk-1/KDR Transkripten im bovinen Cumulus-Oozyten-Komplex.

GREENAWAY et al. (2004) wiesen VEGF und Flk-1/KDR-mRNA und Protein mittels RT-PCR und Immunfluoreszenz an folliculären Granulosazellen in vivo und in vitro nach.

Im Verlauf der Follikelreifung steigt die VEGF- und Flk-1/KDR-Protein-Konzentration. Das VEGF-Flk-1/KDR-System erhöht die Überlebensrate folliculärer Endothel- und Granulosazellen, wie Untersuchungen in vitro kultivierter Endothel- und Granulosazellen belegen. Die Inkubation dieser Zellen mit VEGF führt zu einer Reduktion der Apoptoserate und der Anzahl aktivierter Caspasen-3. Wird Flk-1/KDR durch SU 1498, einen Inhibitor des Tyrosinkinase-Rezeptors, blockiert, können diese Zellen nicht mehr auf endogenes oder exogenes VEGF reagieren. Die Untersuchungen zeigen, dass nicht nur Endothelzellen, sondern auch Granulosazellen, ähnlich wie Endothelzellen, auf endotheliale Wachstumsfaktoren ansprechen (GREENAWAY et al., 2004).

2.2.2.1.2 VEGF im Corpus luteum

In humanen Corpora lutea konnten VEGF, Flt-1 und Flk-1/KDR mittels Immunhistochemie in Luteinzellen dargestellt werden. Flt-1 und Flk-1/KDR waren außerdem in Endothelzellen lokalisiert. Die Untersuchung des Expressionsmusters von VEGF, Flt-1 und Flk-1/KDR-mRNA im Verlauf der An- und Rückbildung des Corpus luteum zeigte, dass in der lutealen Phase verstärkt VEGF, Flt-1 und Flk-1/KDR-mRNA exprimiert wird. Die Ergebnisse der Untersuchungen von SUGINO et al. (2000) veranschaulichen, dass das VEGF-System einen wichtigen Faktor für die Aufnahme und Aufrechterhaltung lutealer Funktionen darstellt.

In Corpora lutea der Ratte wiesen SUGINO et al. (2001) Flt-1 und Flk-1/KDR in Luteinzellen, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen immunhistochemisch nach.

Untersuchungen von BROWN et al. (1997) ergaben, dass humane glatte Muskelzellen aus dem Uterus Flt-1 und Flk-1/KDR exprimieren. Werden diese Zellen mit VEGF inkubiert, beginnen sie zu proliferieren. Es wird daher angenommen, dass das VEGF-System auch die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen im Ovar vermittelt.

Untersuchungen porciner Corpora lutea mittels in situ Hybridisierung zeigten, dass VEGF-mRNA vorwiegend in Granulosaluteinzellen lokalisiert ist. Demgegenüber war Flt-1 und Flk-1-mRNA überwiegend in Thecaluteinzellen zu finden. Untersuchungen der VEGF-Transkripte zeigten, dass es sich dabei in erster Linie um die Isoformen VEGF₁₆₄ handelt (BOONYAPRAKOB et al., 2003). VEGF₁₆₄ gilt als Isoform mit der höchsten mitogenen Aktivität (SOKER et al., 1987). Die Analyse des Expressionsmusters von VEGF, Flt-1 und Flk-1/KDR ergab eine Verringerung der VEGF-mRNA-Expression im Corpus luteum in Rückbildung, eine Verdoppelung der Flt-1-mRNA-Expression am 15. Tag post ovulationem und eine maximale Intensität der Flk-1/KDR-mRNA-Expression um den 12. Tag post ovulationem (BOONYAPRAKOB et al., 2003). Die intensive Expression von Flt-1 und Flk-1/KDR-mRNA zu Beginn der lutealen Phase ist mit der intensiven Angiogenese im heranreifenden Corpus luteum korreliert (RICKE et al., 1999).

Immunhistochemische Untersuchungen boviner Corpora lutea zeigten, dass VEGF 1-2 Tage post ovulationem vorrangig in Luteinzellen zu finden ist. VEGF wird von Luteinzellen freigesetzt und initiiert auf parakrinem Weg angiogene Prozesse im sich heranbildenden Corpus luteum. Im Corpus luteum in Rückbildung ist VEGF in erster Linie im Zytoplasma vaskulärer glatter Muskelzellen lokalisiert. Es wird angenommen, dass VEGF über einen parakrin-autokrinen Mechanismus zu Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen führt (BERISHA et al., 2000).

Die Untersuchung des Expressionsmusters der Transkripte von Flt-1 und Flk-1/KDR zeigte, dass die Flt-1-mRNA-Expression im Verlauf der An- und Rückbildung des bovinen Corpus luteum konstant bleibt. Demgegenüber erreicht die Flk-1/KDR-Expression 3 Tage post ovulationem ihr Maximum (BERISHA et al., 2000). KÄßMEYER und PLENDL (2005) konnten Flk-1-mRNA und Protein außerdem in in vitro kultivierten Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum nachweisen.

Die Bedeutung des VEGF-Flk-1/KDR-Systems für die luteale Angiogenese zeigen Untersuchungen muriner Corpora lutea. Die Applikation eines gegen Flk-1/KDR gerichteten Antikörpers zwei Tage vor der Ovulationsinduktion mittels Pregnant Mare Serum

Gonadotropin/hCG führt zu einer Hemmung der Migration und Proliferation von Endothelzellen. Corpora lutea behandelte Tiere wiesen im Gegensatz zu Corpora lutea unbehandelter Tiere keine Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM)-positiven Zellen auf (ZIMMERMANN et al., 2001). Das auch als CD31 bezeichnete Oberflächenantigen ist auf Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen lokalisiert (MCMICHAEL, 1987; FAVALORO et al., 1989). Gegen PECAM/CD31 gerichtete Antikörper werden in immunhistochemischen Untersuchungen zur Identifizierung von Endothelzellen und angiogenen Blutgefäßen eingesetzt (HORAK et al., 1992).

Die Beteiligung des VEGF/Flt-1-Systems an der lutealen Angiogenese veranschaulichen desweiteren Untersuchungen von WULFF et al. (2001 a) an Corpora lutea von Primaten. Die intravenöse Injektion einer löslichen Form des Flt-1, Flt-1-F_c (VEGF_{trapA40}) am Tag der Ovulation neutralisiert die mitogene Aktivität von VEGF, was zu einer signifikanten Verringerung der endothelialen Zellproliferationsrate von 50 auf 20% führt.

2.2.2.1.3 Regulation des VEGF im Ovar

Als wichtigster Stimulus für die Synthese von VEGF im Ovar gilt LH (DICKSON und FRASER, 2000; SUGINO et al., 2000; ALBERT et al., 2002). Mit LH-Rezeptoren ausgestattete Luteinzellen synthetisieren unter dem Einfluss des Gonadotropins verstärkt VEGF, Flk-1/KDR und Flt-1 (OH et al., 1999; ALBERT et al., 2002). Die Blockierung von endogenem LH mittels eines GnRH-Antagonisten hemmt die luteale Angiogenese (DICKSON und FRASER, 2000; SUGINO et al., 2000). In vivo verringert sich gegen Ende der lutealen Phase die Sensitivität von Luteinzellen gegenüber LH und infolge dessen auch die Expression von VEGF-mRNA (REYNOLDS und REDMER, 1998; FRASER et al., 1999).

Ein weiterer Regulator der VEGF-Expression ist der Blutdruck. Infolge einer Gefäßokklusion erhöht sich der Blutdruck, wie z.B. durch apoptotische Lutein- und Endothelzellen im Falle lutealer Blutgefäße im Corpus luteum in Rückbildung (MODLICH, 1997). Dies führt zu einem Anstieg der Expression des Hypoxie-Induzierenden-Faktors (HIF). HIF verstärkt wiederum die VEGF-Expression (WARNER und MITCHELL, 2003).

2.2.2.2 Angiopoietin-1 und -2 im Ovar

Die Intensität der Ang-1 und Ang-2-mRNA-Expression in Granulosazellen verändert sich im Verlauf der Follikelreifung (HAYASHI et al., 2003). Semiquantitative Untersuchungen ergaben, dass Ang-1-mRNA in Follikeln mit einem Durchmesser von 5 mm und größer exprimiert

wird. Demgegenüber ist in Follikeln mit einem Durchmesser von mehr als 10 mm eine drastische Verringerung der Ang-2-mRNA Expression zu beobachten (HAYASHI et al., 2003). Atretische Follikel wiederum zeigen einen höheren Ang-2:Ang-1-Quotienten (HAYASHI et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass die Follikelatresie durch Destabilisierung von Blutgefäßen eingeleitet wird (HAYASHI et al., 2003).

Im Corpus luteum werden Ang-1 und Ang-2-mRNA in Luteinzellen und Endothelzellen exprimiert (WULFF et al., 2000; HATA et al., 2002).

Ang-2 leitet die luteale Angiogenese ein, indem es die Zellmatrix auflöst und so zur Kontaktinhibition zwischen Endothelzellen und Perizyten führt (WARD und DUMONT, 2002). Unter Einfluss von VEGF induzieren Ang-1 und -2 Migration und Proliferation von Endothelzellen zu komplexen Gefäßnetzen (KOBILIZEK et al., 1998). Ang-1 stimuliert außerdem Endothelzellen, Metalloproteinasen freizusetzen, die zum enzymatischen Ab- und Umbau von Basalmembranen führen und reguliert durch Steuerung der Interaktionen zwischen Endothelzellen und Perizyten die Blutgefäßausreifung im sich entwickelnden Corpus luteum (MAISONPIERRE et al., 1997; PAPAPETROPOULOS et al., 1999; THURSTON et al., 2000). Perizyten stabilisieren die Gefäße durch Hemmung der endothelialen Proliferation und Migration bzw. durch Stimulation der extrazellulären Matrixproduktion. In hohen Konzentrationen verdrängt Ang-2 als kompetitiver Antagonist Ang-1 vom gemeinsamen Rezeptor Tie-2 und blockiert den chemotaktischen Effekt von Ang-1 auf luteale Endothelzellen (MAISONPIERRE et al., 1997; GOEDE et al., 1998; GALE et al., 2002; CARMELIET, 2003).

2.2.3 Weitere angiogene Faktoren im Ovar

Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1), früher auch acidic Fibroblast Growth Factor, wird von Zellen der Theca interna, Granulosazellen und vaskulären glatten Muskelzellen synthetisiert. Die im Verlauf der Follikelreifung zu beobachtende konstante Expression von FGF-1-mRNA hat keinen direkten Einfluss auf die Follikelreifung. Vielmehr ist anzunehmen, dass FGF-1 (CARMELIET, 2000; CUEVAS et al., 2000, MCGEE und HSUEH, 2000) und FGF-2 (PINTUCCI et al., 2005) Schlüsselfaktoren für das Überleben von vaskulären glatten Muskelzellen darstellen.

Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), früher auch basic Fibroblast Growth Factor, wird von Endothelzellen thecaler Kapillaren freigesetzt (BERISHA et al., 2004). Der im Verlauf der Follikelreifung festzustellende Anstieg der FGF-2 mRNA-Expression stimuliert wiederum die Expression von Flk-1/KDR-mRNA (PEPPER und MANDRIOTA, 1998) und modifiziert so die angiogenen Eigenschaften von VEGF zu Beginn der lutealen Angiogenese.

Als wichtige Effektoren lutealer Funktionen gelten außerdem der in der Leber produzierte Insulin-like-Growth-Factor (IGF) und die für den Transport zum Zielgewebe zuständigen Insulin-like-Growth-Factor binding proteins (IGFBP).

IGF-1 stimuliert die Synthese von Progesteron und VEGF in bovinen Granulosaluteinzellen (SCHAMS et al., 2001).

IGFBP-3 spielt eine wichtige Rolle bei angiogenen Prozessen im Corpus luteum. Während der frühen lutealen Phase, wenn zahlreiche Endothelzellen im Rahmen angiogener Prozesse proliferieren, ist eine intensive Expression von IGFBP-3-mRNA in mikrovaskulären Endothelzellen festzustellen. Demgegenüber ist in der späten lutealen Phase und im Verlauf der Luteolyse eine deutliche Verringerung der IGFBP-3-mRNA-Expression zu beobachten (FRASER et al., 2000).

2.3 Anti-Angiogenese im Ovar

Während der Gefäßregression treten anti-angiogene Faktoren auf, die an unterschiedlichen Punkten der Angiogenese ansetzen (MALL, 2003). Während Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren den Abbau der extrazellulären Matrix durch erythrozytäre Proteasen hemmen, blockieren Rezeptorantagonisten oder Antikörper die Migration der Endothelzellen.

Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren hemmen den von Matrixmetalloproteinasen vermittelten Abbau der extrazellulären Matrix (WOESSNER und NAGASE, 2000). Im bovinen Corpus luteum sind dies insbesondere der in Granulosaluteinzellen und vaskulären Muskelzellen lokalisierte TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1) und der in Granulosalutein- und Endothelzellen lokalisierte TIMP-2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-2) (ZHANG et al., 2003). ZHANG et al. (2003) beobachteten im Verlauf der Gelbkörperrückbildung einen Anstieg der TIMP-2-mRNA-Expression. TIMP-2 gilt als potenter Angiogenese-Inhibitor in vivo (FERNANDEZ et al., 2003). Eine verstärkte TIMP-2-Freisetzung reduziert die Proliferationsrate von Endothelzellen (LI et al., 2001) und verringert die Produktion von VEGF (HAJITOU et al., 2001). Die Stimulation der TIMP-1-mRNA-Expression führt gleichfalls zu einer Hemmung der Angiogenese, wie Untersuchungen an einer Vielzahl von Tumoren ergaben (GUEDEZ et al., 2001; BLOOMSTON et al., 2002).

Zu weiteren Faktoren im Ovar, die die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen hemmen, zählen Thrombospondin (TSP) und Endostatin (RODRIGUEZ-MANZANEQUE et al., 2001). Das 1990 erstmals identifizierte Glykoprotein TSP wird von Granulosazellen in die extrazelluläre Matrix freigesetzt (CHEN et al., 2000; BORNSTEIN et al., 2000, PETRIK et al., 2002) (Abb. 3). Endostatin, ein Fragment von Kollagen Typ XVII, wird gleichfalls von ovariellen Zellen

exprimiert (O'REILLY et al., 1997). TSP-1 blockiert die Mobilisierung angiogener Faktoren und deren Bindung an endotheliale Zelloberflächenrezeptoren (TOLSMA et al., 1997). Endostatin bindet als kompetitiver Antagonist an Flk-1/KDR und Flt-1 und verhindert die durch Bindung von VEGF₁₆₅ initiierte Rezeptoraktivierung (KIM et al., 2002).

Zu den endogenen Rezeptorantagonisten pro-angiogener Faktoren zählen neben TSP (VOLPERT, 2000; PETRIK et al., 2002; GREENAWAY et al., 2005) und Endostatin (JUNG et al., 2002; KIM et al., 2002; CHURA-CHAMBI et al., 2004), Ang-2 (MAISONPIERRE et al., 1997) und der von Thrombozyten sezernierte Platelet Factor-4 (PF-4) (PEROLLET et al., 1998; BIKFALVI, 2004; BIKFALVI und GIMENEZ-GALLEGO, 2004).

PF-4 hemmt die für die Aktivierung des FGF-R2 erforderliche heparininduzierte Bildung von FGF-2-Dimeren, wie Untersuchungen an ovariellen Zellen vom Hamster belegen. Die Inkubation der Zellen mit FGF-2, Heparin und PF-4 reduziert die Bildung von Dimeren um ca. 30%. Es wird angenommen, dass PF-4 die Assoziation zweier FGF-2-Moleküle verhindert, indem er mit einem FGF-2-Molekül einen Komplex bildet. PF-4 hemmt außerdem die Bindung von FGF-2-Molekülen an den Rezeptor, indem er mit FGF-2 um das für die Bindung erforderliche Heparinsulfat konkurriert (PEROLLET et al., 1998).

Der Einsatz von Antikörpern gegen pro-angiogene Faktoren wie z.B. VEGF und VEGF-R2 hemmt die thecale Angiogenese (WULFF et al., 2002) und verzögert die Follikelreifung (ZIMMERMANN et al., 2001b). Untersuchungen von WULFF et al. (2002) ergaben, dass die Applikation einer kombinierten löslichen Form des Flt-1 und KDR/Flk-1-Rezeptors (VEGF_{Trap R1R2}) während der folliculären Phase, die thecale Angiogenese in Sekundär- und Tertiärfollikeln blockiert. Die Hemmung der folliculären Angiogenese steht in engem Zusammenhang mit der Verzögerung des Follikelwachstums (WULFF et al., 2002). Nach der Applikation einer löslichen Form des Flt-1-Rezeptors (VEGF_{trap}) am Tag der Ovulation ist eine deutliche Verringerung der endothelialen Zellproliferation festzustellen. Der Einsatz von VEGF_{trap} am dritten Tag der lutealen Angiogenese hemmt den Fortgang angiogener Prozesse (WULFF et al., 2001a). In diesem anti-angiogenen Milieu führt die Ablösung der Endothelzellen von der unterlagerten Matrix zur Gefäßregression (BENJAMIN et al., 1998).

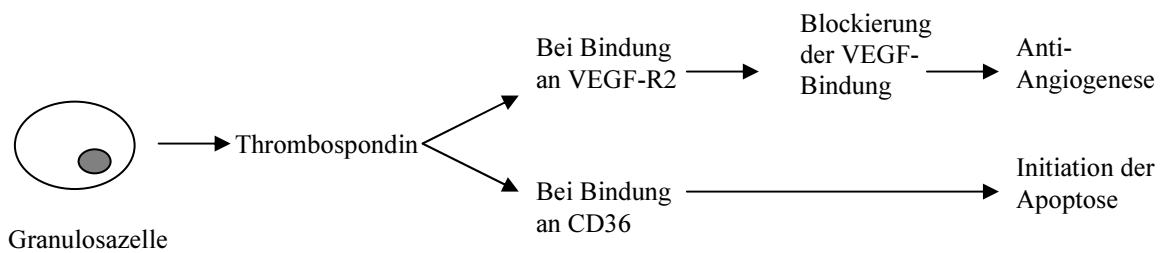


Abb. 3: Mechanismus der Angiogenese-Inhibition durch Thrombospondin-1.

2.4 Vaskuläre Regression im Ovar

In vivo verringert sich im infertilen Zyklus gegen Ende der lutealen Phase die Sensitivität von Luteinzellen gegenüber LH (FRASER et al., 2000). Demgegenüber erreicht die Anzahl von LH-Rezeptoren im Endometrium gegen Ende der lutealen Phase ihr Maximum (STEPIEN et al., 1999). LH erhöht die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese. Untersuchungen von ZIECIK et al. (2000) an in vitro kultivierten porcinen Zellen aus dem Endometrium zeigten zwischen dem 12. und 13. Tag post ovulationem eine erhöhte $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration im utero-ovariellen venösen Plasma. $\text{PGF}_{2\alpha}$ gilt insbesondere beim Wiederkäuer als primäres Luteolysin (TSAI und WILTBANK, 1998; MEIDAN et al., 1999).

$\text{PGF}_{2\alpha}$ vermindert den ovariellen Blutfluss indem es die intraluteale Produktion vasoaktiver Substanzen wie z.B. ET-1 und Angiotensin II (Ang II) erhöht (ACOSTA et al., 2002). ET-1 und Ang II verringern den intralutealen Blutfluss durch Vasokonstriktion. Luteale Endothelzellen setzen zunächst eine inaktive Vorstufe des ET-1 frei. Luteinzellen und Endothelzellen synthetisieren das Endothelin-Converting Enzyme (ECE), das diese Vorstufe in die aktive Form überführt. MEIDAN und LEVY (2002) und BOITI et al. (2005) beobachteten im Verlauf der Luteolyse einen deutlichen Anstieg der ECE und ET-1-mRNA-Expression im Corpus luteum. Die vasokonstriktorische Aktivität von ET-1 wird von ET-Rezeptoren vermittelt, die auf Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen größerer ovarieller Blutgefäße lokalisiert sind (GIRSH und DEKEL, 2002; BOITI et al., 2005). Durch endotheliales Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) aktiviertes Ang II wird von Lutein- und Endothelzellen freigesetzt (HAYASHI et al., 2000; 2003; SCHAMS et al., 2003). HAYASHI et al. (2000) und SCHAMS et al. (2003) stellten im Verlauf der Luteolyse eine verstärkte Expression von ACE und Ang II-mRNA fest. Die gefäßverengende Wirkung von Ang II wird von Angiotensin-Rezeptoren vermittelt, die auf Lutein- und Endothelzellen zu finden sind (HAYASHI et al., 2000; SCHAUSER et al., 2001).

2.5 Apoptose lutealer Endothelzellen im Ovar

Die verminderte Durchblutung der Gefäße steht als auslösender Faktor für den programmierten Zelltod von Endothelzellen an erster Stelle. DAVIS et al. (2003) und PRU et al. (2003) beschrieben, dass die lutealen Kapillaren als erste Zellpopulation während der Luteolyse apoptotisch zugrunde gehen. TANAKA et al. (2004) beobachteten während der mittels einer PGF_{2α}-Injektion induzierten Luteolyse einen akuten und dauerhaften Anstieg der Ang-2-mRNA-Expression. Es ist anzunehmen, dass PGF_{2α} die Freisetzung von Ang-2 stimuliert und die Blutgefäßstabilisierung durch den akuten Anstieg der Ang-2-Konzentration eingeleitet wird. Die Untersuchungen von TANAKA et al. (2004) ergaben weiter, dass Ang-2 die Freisetzung von Progesteron durch Luteinzellen hemmt. Ang-2 hemmt möglicherweise den stimulierenden Effekt von Ang-1 auf die Sekretion von Progesteron, indem es als kompetitiver Antagonist an Tie-2 bindet. Die anti-apoptotischen Eigenschaften des Luteotropins wie z.B. die Induktion der Expression apoptosehemmender Proteine wie z.B. Bcl-2 entfallen. Mit dem Absinken des Progesteronspiegels werden erste apoptotische Zellveränderungen sichtbar (RUEDA et al., 1995).

Im Uterus und Ovar gebildetes PGF_{2α} stimuliert die Expression von MCP-1-mRNA in lutealen Endothelzellen (PENNY et al., 1998). Es kommt zur massiven Einwanderung TNF α freisetzender Makrophagen in das sich zurückbildende Corpus luteum (WUTTKE et al., 1997). 36 Stunden nach Einleitung der Luteolyse mittels PGF_{2α} können im bovinen Corpus luteum mehr als 100 pg/ml TNF α gemessen werden (SHAW und BRITT, 1995). TNF α vermittelt die Apoptose von lutealen Endothelzellen (Abb. 4). Untersuchungen kultivierter mikrovaskulärer Endothelzellen aus dem bovinen Corpus luteum belegen, dass TNF α zu einer signifikanten Reduktion vitaler Zellen führt. TNF α initiiert die Apoptosekaskade durch Bindung an TNF-Rezeptor-1 (TNFR-1) (PRU et al., 2003). FRIEDMAN et al. (2000) fanden, dass die Expression von TNFR-1-mRNA in Endothelzellen mit Einsetzen der Luteolyse ansteigt. Nach der extrinsischen Aktivierung durch Bindung von TNF α bindet TNFR-1 zunächst ein zusätzliches Molekül, TRADD (Tumor Necrosis Factor associated Death Domain) und rekrutiert dann mittels dieser Domäne FADD (Fas-associated death domain) und FLICE (FADD like Interleukin Converting Enzyme)/Procaspase-8 (HSU et al., 1995). Procaspasen, die inaktive Form der als Caspasen bezeichneten spezifischen Proteasen, findet man in allen Zellen. FLICE/Procaspase-8 wird nach Abspaltung seiner Prodomäne autokatalytisch gespalten und am Rezeptorkomplex in die aktive Caspase-8 überführt (EARNSHAW et al., 1999). Caspase-8 steht am Anfang der Kaskade. Die aktive Caspase-8 initiiert durch proteolytische Spaltung weiterer Caspasen die Caspasekaskade. Caspasen greifen durch die

proteolytische Spaltung immer in den Brückenbereichen zwischen den an Histone gebundenen DNA-Strängen in die Kondensation und Fragmentierung der DNA ein. Es entstehen nukleosomale Teilstücke in einer Größe von ca. 180 Basenpaaren (SAHARA et al., 1999). Die enzymatische Spaltung erfolgt zu einem Zeitpunkt, an dem die apoptotischen Prozesse nicht mehr reversibel sind. Weitere Ziele der Caspasen sind Proteine des Zytoskeletts wie Aktin und Gelsolin. In einigen Zellen wird Aktin gespalten. Gelsolin ist durch Reorganisation von Aktin für typische morphologische Veränderungen wie Membranblebbing zuständig (SABOURIN et al., 2000). Die Spaltung des Proteins führt zur spät eintretenden Kernfragmentierung. Es entstehen membranumhüllte so genannte Apoptosekörperchen, die von Phagozyten aufgenommen werden (SABOURIN et al., 2000).

Das proapoptotische $\text{PGF}_{2\alpha}$ vermittelt auch auf intrinsischem Weg die Apoptose (Abb. 4). Durch Erhöhung proapoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie führt es zur Veränderung der mitochondrialen Permeabilität (YADAV et al., 2005). Namensgeber dieser Familie ist das Protoonkogen B-cell-lymphoma-gene (Bcl-2) (TSUJIMOTO und CROCE, 1989). Das anti-apoptotische Bcl-2 stabilisiert das mitochondriale Transmembranpotential (FERRI und KROEMER, 2001; MARTINOU und GREEN, 2001), das unter physiologischen Bedingungen durch den Elektronentransport der Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran aufrechterhalten wird. Die proapoptotisch wirkenden Bcl-2 Homologen wie z.B. Bax, Bad, Bak und Bcl-Xs initiieren die Bildung von Poren oder Ionenkanälen in der äußeren Mitochondrienmembran (TSUJIMOTO und SHIMIZU, 2000; ARMSTRONG, 2006). Die Bildung von Poren oder Ionenkanälen an den Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran führt zum Verlust des Transmembranpotentials. Durch die geöffneten Poren werden Cytochrom C, Apoptotic Protease Activating Factor (Apaf-1) und Apoptosis Inducing Factor (AIF) freigesetzt (MIRAMAR et al., 2001).

$\text{PGF}_{2\alpha}$ erhöht außerdem die Kalziumkonzentration in bovinen lutealen Endothelzellen (CHOUHDARY et al., 2005) und initiiert so deren Apoptose. LYNCH et al. (2000) zeigten am Beispiel lutealer Zellen, dass die Zugabe eines intrazellulären Kalziumchelatbildners die Apoptose hemmt. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ist mit einem Anstieg der Kalziumkonzentration in den Mitochondrien verbunden (GREEN und REED, 1998). Cytochrom C wird freigesetzt, das wiederum die Caspaseaktivität stimuliert (SLEE et al., 1999). Die Akkumulation von Kalzium im Zellkern führt zur Aktivierung von Endonukleasen, die die DNA in die für die Apoptose charakteristischen 180 Basenpaare umfassenden Fragmente spalten (BOONE et al., 1995).

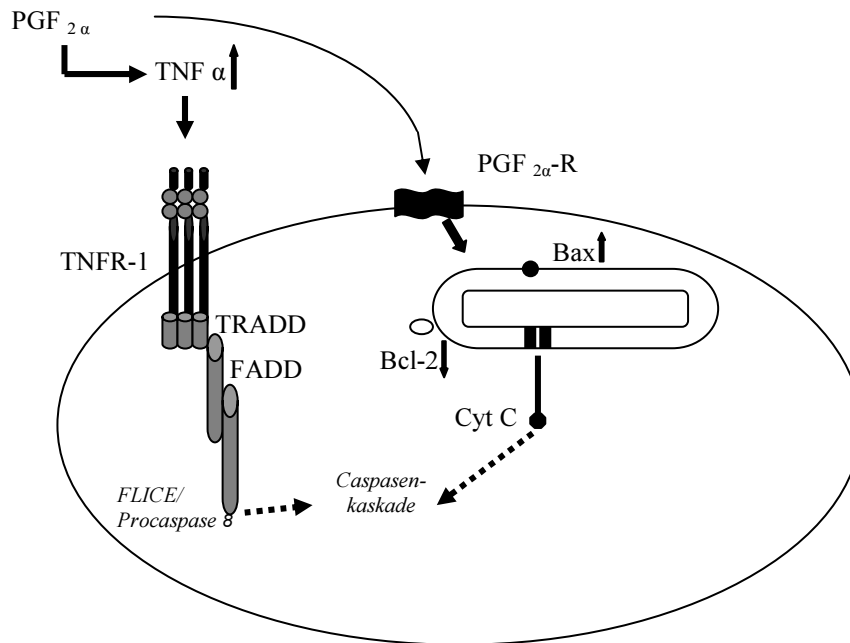


Abb. 4: Apoptose lutealer Endothelzellen

2.6 Leukozyten im Ovar

Im Corpus luteum regulieren mikrovaskuläre Endothelzellen die zyklische Akkumulation spezifischer Leukozytenpopulationen (DAVIS et al., 2003).

Im sich heranbildenden Corpus luteum ist eine Akkumulation eosinophiler Granulozyten, im sich zurückbildenden Corpus luteum eine Akkumulation von Makrophagen (PATE und LANDIS, 2001; TOWSON et al., 2002) und Lymphozyten (BUKULMEZ und ARICI, 2000) festzustellen. Die Einwanderung eosinophiler Granulozyten wird von RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), einem von Endothelzellen freigesetzten Zytokin stimuliert (AUST et al., 1999; LEHMANN et al., 2000). Eosinophile Granulozyten sezernieren proteolytische Enzyme wie z.B. Kollagenasen und Elastasen, die extrazelluläre Matrixproteine auflösen und so eine wichtige Rolle für die Induktion angiogener Prozesse im Corpus luteum spielen (BUKULMEZ und ARICI, 2000). Die Einwanderung aktivierter Makrophagen zu Beginn der Luteolyse wird von MCP-1, einem gleichfalls von Endothelzellen produziertem Chemokin induziert (PENNY, 2000). Zu den Funktionen der massenhaft einwandernden Makrophagen gehört unter anderem die Phagozytose zugrunde gegangener Zellen und die Stimulation der PGF_{2α}-Sekretion (NISWENDER et al., 2000).

Makrophagen produzieren IL-1 und TNF α . IL-1 verstärkt die Phagozytoseaktivität der Makrophagen.

2.7 Mit Angiogenese assoziierte Fortpflanzungsstörungen

Die weiblichen Reproduktionsorgane (Ovar, Uterus und Plazenta) zeigen reguläre Intervalle rapiden Wachstums, wobei Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt.

Eine Vielzahl von Fortpflanzungsstörungen ist mit einer Störung angiogener Prozesse, insbesondere kontrollierter Blutgefäßneu- und Rückbildung assoziiert. Dazu zählen unter anderem das bereits erwähnte OHSS, das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS), Anovulation, Follikelatresie und ovarielle Tumore (REYNOLDS et al., 2002).

2.7.1 Das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS)

Das PCOS ist als eine der Hauptursachen für die Infertilität der Frau anzusehen. Die pathogenetisch wichtigsten Faktoren in der Entstehung des zu Anovulation führenden (NORMAN, 2001) PCOS sind Hyperplasie und Hypervaskularisierung der Theca interna und des umgebenden Stromas (ABBOTT et al., 2002; PAN et al., 2002; FERRARA et al., 2003). Als Schlüsselfaktor physiologischer und pathologischer Angiogenese im Ovar gilt VEGF (FERRARA, 1999). Die VEGF-Konzentration im Serum an PCOS erkrankter Frauen ist im Vergleich zu gesunden Probandinnen um 25% erhöht (TULANDI et al., 2000). Nach der Behandlung mit VEGF-Inhibitoren gehen die zystisch entarteten Follikel atretisch zugrunde und die ovarielle vaskuläre Permeabilität nimmt ab (PARANEZHAD et al., 2003). Ein weiterer angiogener Faktor in der Pathogenese des PCOS ist Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF). EG-VEGF wurde als spezifisches Mitogen identifiziert, das selektiv auf Endothelzellen endokriner Drüsen wirkt (FERRARA et al., 2003). EG-VEGF induziert Migration, Proliferation und Fenestration mikrovaskulärer Endothelzellen aus endokrinen Drüsen (LECOUTER et al., 2001). Physiologischerweise wird EG-VEGF-mRNA in Primordial- und Primärfollikeln exprimiert und ist möglicherweise für deren Nährstoffversorgung von Bedeutung. In präovulatorischen Follikeln wird EG-VEGF-mRNA in erster Linie von den Zellen der Theca folliculi exprimiert. Im Corpus luteum hingegen ist keine signifikante Expression von EG-VEGF festzustellen (LECOUTER et al., 2001). In polyzystischen Ovarien ist EG-VEGF in Zellen der Theca interna und im ovariellen Stroma lokalisiert, während VEGF vorwiegend in Granulosazellen und nur vereinzelt in Zellen der Theca interna zu finden ist (FERRARA et al., 2003). Die Untersuchungen von

FERRARA et al. (2003) belegen, dass die in Verbindung mit PCOS auftretende Hypervaskularisierung von VEGF und EG-VEGF vermittelt wird. EG-VEGF ist möglicherweise von größerer Bedeutung für das PCOS. Es ist anzunehmen, dass die Hemmung von VEGF und EG-VEGF einen effektiven Therapieansatz für die Behandlung des PCOS darstellt.

2.7.2 Krankhafte Follikelatresie und Anovulation

Angiogenese ist ein wichtiger Regulator follikulärer Funktionen (REDMER und REYNOLDS, 1996). Die Thecazelllage oviner präovulatorischer Follikel ist im Vergleich zu der Thecazelllage atretischer Follikel intensiver vaskularisiert. MATTIOLI et al. (2001) und JIANG et al. (2003) stellten fest, dass die Anzahl thecaler Kapillaren während der Follikelatresie bei zahlreichen Spezies einschließlich dem Rind abnimmt. Gegenüber gesunden heranreifenden Follikeln ist die Anzahl intakter Kapillaren in krankhaften atretischen bovinen Follikeln deutlich reduziert. HAYASHI et al. (2003) beobachteten in frühen atretischen bovinen Follikeln einen Anstieg des Ang-2:Ang-1 Quotienten und der Tie-2-mRNA-Expression in Zellen der Theca interna. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Ang/Tie-System in frühen atretischen Follikeln die Destabilisierung von Gefäßen induziert. WULFF et al. (2001a) fanden, dass die Expression von VEGF und Flt-1-mRNA in frühen atretischen Follikeln von Primaten reduziert ist. Es ist anzunehmen, dass das aktivierte Ang/Tie-System in Verbindung mit einer niedrigen VEGF Konzentration die Gefäßregression in frühen atretischen Follikeln bedingt.

Untersuchungen von Greenaway et al. (2004) ergaben, dass VEGF und Flk-1/KDR in vivo und in vitro von bovinen follikulären Granulosazellen synthetisiert werden. VEGF verlängert die Überlebensdauer boviner Granulosazellen in vitro, indem er die Expression apoptoseinduzierender Enzyme wie z.B. Bax hemmt. Dieser zytoprotektive Effekt wird durch Hemmung von Flk-1/KDR blockiert. Der Vergleich boviner präovulatorischer und atretischer Follikel zeigt deutliche Unterschiede in Bezug auf die Anzahl apoptotischer Zellen und die Flk-1/KDR-mRNA-Expression. Präovulatorische Follikel exprimieren im Vergleich zu atretischen Follikeln verstärkt Flk-1/KDR-mRNA. Infolge dessen sind in präovulatorischen Follikeln im Vergleich zu atretischen Follikeln deutlich weniger apoptotische Zellen zu sehen. Ein Mangel an endogenem VEGF bedingt demnach Follikelatresie und daraus resultierende Anovulation.

2.7.3 Ovarielle Tumoren

Einer amerikanischen Studie über den Zeitraum von 1979-1996 an 600400 Krebspatientinnen zufolge beträgt der Anteil von Tumorerkrankungen des Genitaltraktes 13% und liegt damit an dritter Stelle hinter Tumorerkrankungen der Mamma (31%) und des Verdauungstraktes (18%) (REYNOLDS et al., 2002). Tumorwachstum ist von einer intensiven Angiogenese begleitet. Die Etablierung eines eigenen Blutgefäßsystems ist essentiell für die Versorgung proliferierender Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff (GOTH et al., 2003). Im Rahmen von Tumorerkrankungen kommt es zu einer Deregulation angiogener Prozesse in Form einer Imbalanz endogener Angiogenese-Stimulatoren und Angiogenese-Inhibitoren zugunsten der Stimulatoren (BROWN et al., 2000). Infolge der gesteigerten Angiogenese erhöht sich die vaskuläre Dichte. Am Beispiel ovarieller Karzinome konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte vaskuläre Dichte mit einer gesteigerten Inzidenz von Metastasen und einer verringerten Überlebensrate korreliert ist (ABULAFIA und SHERER, 2000; BROWN et al., 2000; KOHN und LIBUTTI, 2001). Tumoren besitzen die Fähigkeit zur Synthese und Freisetzung von VEGF, Kollagenasen und Heparinasen (GOTH et al., 2003). In ovariellen epithelialen Tumoren ist eine erhöhte Konzentration von VEGF und Flk-1 festzustellen. GUPTA et al. (2003) beobachteten eine erhöhte Konzentration von Cyclooxygenase-1 (COX-1)-mRNA und Cox-1-Protein. Cox-1 fördert wiederum die von Arachnidonsäure stimulierte Produktion von VEGF. Die Expression von VEGF gilt als negatives prognostisches Kriterium für den Verlauf einer Tumorerkrankung (PALEY et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1997).

In den letzten Jahren sind potentielle Angiogenesehemmer zunehmend Gegenstand intensiver klinischer Forschung geworden. Ziel dieser Therapie ist es, das Wachstum und die Metastasierung eines Primärtumors zu verhindern. Dies könnte bedeuten, dass das Auftreten von Rezidiven nach kurativer Resektion respektive das Auftreten von Metastasen durch die dauerhafte Gabe eines Angiogenesehemmers verhindert werden. Ein wichtiger Therapieansatz ist die Hemmung der Gefäßneubildung durch Inhibition des Wachstumsfaktors VEGF durch Rezeptorantagonisten oder Antikörper (MALL, 2003).