

# Invasion and angiogenesis in endometriosis : experimental studies in the chick embryo chorioallantoic membrane

Citation for published version (APA):

Maas, J. W. M. (2001). *Invasion and angiogenesis in endometriosis : experimental studies in the chick embryo chorioallantoic membrane*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20010622jm>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2001

**DOI:**

[10.26481/dis.20010622jm](https://doi.org/10.26481/dis.20010622jm)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## ■ Summary

Endometriosis is the presence of tissue with epithelial and stromal characteristics of endometrium outside the uterine cavity. The implantation theory on the pathogenesis of endometriosis is widely accepted. It presumes retrograde transportation of viable endometrial cells during menstruation, adhesion of these cells onto the peritoneum, with subsequent implantation and proliferation. Research has been focussed, so far, on identifying viable endometrial cells in peritoneal fluid and adhesive potential of endometrial cells to the peritoneal lining. It is still not clear what occurs between retrograde seeding of endometrial cells and the clinical recognition of endometriotic lesions.

Implantation may require, besides adhesion, also invasion of endometrial cells and from that stage onwards these cells will depend on the formation of new blood vessels, angiogenesis, for further outgrowth and development into an endometriotic lesion.

In chapter 1 the current concepts on invasion and angiogenesis, in general as well as with regard to normal endometrium and endometriosis, are described. Because both invasion and angiogenesis are studied with the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM), this model is explained in detail, including its history and applications. The aims of this thesis are stated in chapter 2:

- to assess the invasive and angiogenic potential of endometrial cells;
- to investigate whether endometriosis-like lesions can be formed in the CAM model;
- to assess the angiogenic activity of peritoneal fluid of patients with endometriosis and to identify an associated angiogenic factor.

In chapter 3 the invasive potential of endometrial cells is studied using the CAM model. Suspensions of endometrium carcinoma (ECC-1) cells, menstrual effluent cells, or glandular structures and/or stromal cells obtained from endometrial biopsies were explanted onto the CAM. The explants including the surrounding CAM were excised at daily intervals and analyzed using immunohistochemistry. ECC-1 cells were invasive and could be found in the mesenchymal layer at 5 days after explantation, which validated the CAM model and our methods to study invasion. Both endometrial epithelial glandular structures and stromal cells, but not single epithelial or shed menstrual cells, were invasive in the CAM model. We suggest that number, viability and structural integrity of endometrial glandular structures surrounded by stromal cells in the peritoneal cavity are important factors in the development of endometriosis.

In chapter 4 endometrial fragments, consisting of glands and stromal cells, are explanted onto the CAM. The grafts including the surrounding CAM were excised at 24, 48 or 72 hours after explantation, fixed and embedded in paraffin for immunohistochemistry and in situ hybridization (ISH). After 24 hours of incubation, direct contact between endometrial stromal as well as epithelial cells of the explant and the mesenchymal layer of the CAM was observed. Invasion of both stromal cells and intact

endometrial glands into the mesenchymal layer was observed after 48 hours. At 72 hours, endometriosis-like lesions, which consisted of dilated glands and stromal cells, were observed in the mesenchymal layer. In the lesions the epithelial and stromal cells showed ISH-signals specific for human chromosome 1, confirming their human origin. In conclusion, after 3 days of incubation, endometriosis-like lesions consisting of human endometrial glands and stromal cells, are found in the mesenchymal layer of the CAM. These lesions apparently result from the invasion of intact human epithelial structures and stromal cells.

In chapter 5 an objective method of quantitation of the vascular response of the CAM to endometrium tissue is developed. Samples of proliferative endometrium and control mouse skin tissue were explanted onto the CAM. Additional controls consisted of normal unmanipulated CAM. Four days after grafting, photographs of the explant and the surrounding area were taken *in ovo* to measure the vascular density index (VDI). The VDI is a stereological estimate of vessel number and length, which was obtained by counting the intersections of vessels with a circular grid superimposed on a computerized image. Endometrium tissue caused a significant increase in VDI as compared to the controls. The intra-observer variability was 5.2%. This study demonstrates that the CAM assay is a suitable model to assess the angiogenic properties of endometrium. Furthermore, our method allows detailed quantitation of the vascular response in an objective and reproducible way.

In chapter 6 the method, as described in chapter five, is used to assess the angiogenic potential of endometrium obtained at different phases of the menstrual cycle. Endometrium tissue, independent of the phase of the menstrual cycle, caused a significant increase in VDI as compared to the negative controls. There was a significant difference in angiogenic response between the phases of the menstrual cycle. The VDIs of the early proliferative, early secretory and late secretory phase were significantly higher than the VDI of the late proliferative phase. Evidently, human endometrium is angiogenic throughout the menstrual cycle and shows cyclic variation. It was suggested that elongation of existing vessels during the early proliferative phase as well as growth and coiling of the spiral vessels during the secretory phase may demand for higher angiogenic activity than outgrowth and maintenance of vessels during the late proliferative phase.

In chapter 7 the angiogenic activity of peritoneal fluid from 52 women with minimal to mild endometriosis is determined. Subsequently, the relationship between this angiogenic activity and the concentration of some angiogenic factors or clinical variables, such as phase of menstrual cycle, type of lesion and rASRM classification of endometriosis was investigated. Eighty-five percent of the peritoneal fluid samples induced angiogenesis in the CAM bioassay. TNF- $\alpha$  and total protein were significantly related to the VDI, whereas IL-1 $\beta$ , IL-8 and the clinical variables appeared not to affect the angiogenic response. This study clearly confirms previous findings of peritoneal fluid angiogenic activity in women with minimal to mild endometriosis and indicates the involvement of TNF- $\alpha$ .

In chapter 8 the results of the studies are discussed and some future perspectives are given. It has been demonstrated that endometrial cells have invasive as well as angiogenic potential, moreover, we have been able to establish endometriosis-like lesions in the CAM model. Future research should be focussed on the identification of gene products, which are associated with the invasive properties. Furthermore, since the development of new blood vessels is a prerequisite for further outgrowth of the invaded cells into an endometriotic lesion, studies on blocking angiogenesis are of therapeutical importance. Another approach may be gene therapy or immunotherapy, for which first specific endometriotic and/or endothelial cell markers have to be identified.



## ■ **Samenvatting**

Endometriose is de aanwezigheid van endometrium epitheel- en stromacellen buiten de baarmoederholte. De meest geaccepteerde theorie om de pathogenese van endometriose te verklaren is de implantatietheorie. Deze theorie veronderstelt retrograde menstruatie van vitale endometriumcellen via de tubae naar de buikholte, hechting van deze cellen aan het peritoneum gevolgd door implantatie en proliferatie. Tot nu toe is onderzoek gericht geweest op de identificatie van endometriumcellen in peritoneumvloeistof en het vermogen van endometriumcellen zich te hechten aan het peritoneum. Het is echter niet duidelijk welke stappen er plaatsvinden tussen het moment van aanhechting en de aanwezigheid van endometriosehaarden. Voorafgaande aan implantatie moet adhesie en invasie van endometriumcellen hebben plaatsgevonden. Deze geïnvadeerde cellen zullen voor de ontwikkeling tot een endometriosehaard afhankelijk zijn van de vorming van nieuwe vaten, een proces dat angiogenese wordt genoemd.

In hoofdstuk 1 worden de huidige inzichten ten aanzien van invasie en angiogenese beschreven, zowel in het algemeen als gerelateerd aan endometrium en endometriose. Invasie en angiogenese kunnen beide bestudeerd worden met behulp van het chorio-allantois membraan (CAM) van het kippenembryo. Het CAM-model wordt uitgebreid besproken, waarbij wordt ingegaan op ontwikkelingen en actuele toepassingen.

In hoofdstuk 2 worden de doelstellingen van dit proefschrift uiteengezet:

- bestuderen van de invasieve en angiogene eigenschappen van endometriumcellen;
- onderzoeken of endometriose-achtige haarden gevormd kunnen worden in het CAM;
- bepalen van de angiogene activiteit in peritoneumvloeistof van vrouwen met endometriose en de hiervoor verantwoordelijke angiogene factoren identificeren.

In hoofdstuk 3 worden met behulp van het CAM-model de invasieve eigenschappen van endometriumcellen bestudeerd. Hiervoor werden op het CAM suspensies aangebracht van endometrium carcinoomcellen (ECC-1), van cellen uit menstratievocht en van klierbuizen en/of stromale cellen, verkregen van endometriumbiopsies. Na incubatie werd dit gebied uitgesneden en met behulp van immunohistochemie geanalyseerd. ECC-1 cellen invadeerden het CAM, wat de geschiktheid van dit model voor het bestuderen van invasie bevestigde. Intacte klierbuizen en stromale cellen bleken invasief, in tegenstelling tot cellen uit menstratievocht en losse epitheelcellen. We veronderstellen dat het aantal, de vitaliteit en het intact zijn van door stromale cellen omgeven klierbuizen in de peritoneumvloeistof, belangrijke factoren zijn in de pathogenese van endometriose.

In hoofdstuk 4 hebben we derhalve endometriumfragmenten, bestaand uit grote aantallen klierbuizen en stromale cellen, op het CAM geplaatst. Dit gedeelte van het CAM werd 24, 48 of 72 uur later uitgesneden, gefixeerd en ingebed in paraffine voor immunohistochemie en in situ hybridisatie (ISH). Na 24 uur bestond er direct con-

tact tussen zowel stromale als epitheliale cellen van het endometriumfragment met de mesenchymale laag van het CAM. Na 48 uur vond er invasie in het mesenchym plaats van stromale cellen en intacte klierbuizen. Na 72 uur troffen we endometriose-achtige haarden aan in de mesenchymale laag van het CAM. Deze haarden bevatten verwijde epitheliale buizen en stromale cellen, die positieve ISH-signalen lieten zien voor humaan chromosoom 1. Dit bevestigde de humane afkomst van deze haarden in het CAM. Drie dagen na het aanbrengen van endometriumfragmenten op het CAM worden er dus endometriose-achtige haarden, bestaande uit humane klierbuizen en stromale cellen, aangetroffen in het mesenchym. Deze haarden ontstaan naar alle waarschijnlijkheid door invasie van intacte humane klierbuisstructuren en stromale cellen.

In hoofdstuk 5 worden de door ons ontwikkelde objectieve kwantificatie van de angiogene reactie op endometriumweefsel beschreven. Fragmenten van proliferatief endometrium en - als controlemateriaal - stukjes huid van een muis werden op het CAM gelegd. Vier dagen na het opbrengen van het weefsel werden er dia's gemaakt in ovo van het gebied rondom het weefsel. De dia werd ingelezen in de computer waarna er een grid met concentrische cirkels over de ingelezen dia werd geplaatst. Het aantal doorkruisingen van de bloedvaten met de binnenste vijf cirkels werd geteld. Op deze manier werd de Vascular Density Index (VDI) verkregen, een maat voor het aantal en de lengte van de vaten. Endometrium induceerde een significante stijging van de VDI. De intra-observer variabiliteit was slechts 5.2%. We toonden aan dat het CAM een bruikbaar model is om de angiogene eigenschappen van endometriumweefsel te bestuderen. Onze methode maakt het mogelijk de angiogene reactie op een objectieve en reproduceerbare manier te bepalen.

In hoofdstuk 6 hebben we deze methode gebruikt om de angiogene eigenschappen te bepalen van endometriumweefsel verkregen in verschillende fases van de menstruele cyclus. Endometrium, onafhankelijk van de dag waarop weefsel is afgenomen, induceerde een significante stijging van de VDI in vergelijking tot de negatieve controles. De VDI's van de vroeg-proliferatieve, vroeg-secretoire en laat-secretoire fase waren significant hoger dan de VDI van de laat-proliferatieve fase. Hieruit volgt dat humaan endometrium angiogeen is gedurende de gehele cyclus en dat de mate van angiogenese bovendien een cyclische variatie vertoont. We veronderstellen dat verlenging van bestaande vaten tijdens de vroeg-proliferatieve fase en groei en draaiing van de spiraalarteriën tijdens de secretoire fase meer angiogene activiteit vergt dan uitgroei en handhaving van vaten tijdens de laat-proliferatieve fase.

In hoofdstuk 7 is de angiogene activiteit van peritoneumvloeistof van vrouwen met minimale tot milde endometriose bepaald. Vervolgens is de correlatie onderzocht van deze angiogene activiteit met de concentratie van enkele angiogene factoren alsmede met klinische variabelen, zoals fase van de menstruele cyclus, type laesie en rASRM classificatie. Van de onderzochte peritoneumvloeistofmonsters induceerde 85% angiogenese in het CAM. TNF- $\alpha$  en totaal eiwit correleerden significant met de

VDI, terwijl IL-1 $\beta$ , IL-8 en de klinische variabelen geen invloed hadden op de angiogene reactie. Deze studie bevestigt eerder aangetoonde angiogene activiteit van peritoneumvloeistof van vrouwen met endometriose en geeft bovendien een aanwijzing dat TNF- $\alpha$  hiervoor medeverantwoordelijk is.

In hoofdstuk 8 worden de resultaten van de studies bediscussieerd en worden voorstellen gedaan voor toekomstig onderzoek. We hebben aangetoond dat endometriumcellen tot invasie in staat zijn en angiogenese kunnen induceren. Bovendien bleek het mogelijk endometriose-achtige haarden in het CAM te laten ontwikkelen. Toekomstig onderzoek zou zich onder andere kunnen richten op de identificatie van genproducten die geassocieerd zijn met het invasieve gedrag. Omdat geïnvadeerde cellen voor verdere groei en ontwikkeling afhankelijk zijn van de vorming van nieuwe bloedvaten, zullen studies gericht op het remmen van angiogenese van belang zijn voor toekomstige therapeutische mogelijkheden. Voor behandelingsmogelijkheden, zoals gen- en immunotherapie, dienen specifieke endometriose- en/of endotheelcelmarkers geïdentificeerd te worden.