

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. W. Laschke, Ph.D.)

Die Wirkung von Ellagsäure und Indol-3-Carbinol auf Endometrioseherde im Mausmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2024

vorgelegt von Madeleine Becker
geb. am 04.04.1996 in Höxter

Tag der Promotion:	31.03.2025
Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Werner Laschke, Ph.D. Prof. Dr. med. Erich-Franz Solomayer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Endometriose	5
3.1.1	Definition und Epidemiologie	5
3.1.2	Einteilung und Symptomatik	5
3.1.3	Diagnostik und Klassifikation	7
3.1.4	Ätiologie	8
3.1.5	Pathogenese	9
3.1.6	Therapie	11
3.2	Forschung	12
3.3	Substanzen	14
3.3.1	ES	14
3.3.2	I3C	17
4	Zielstellung	21
5	Material und Methoden	22
5.1	Ethikerklärung	22
5.2	Versuchstiere	22
5.3	Modell der intraperitonealen Endometriose	22
5.3.1	Bestimmung des Zyklusstadiums	22
5.3.2	Entnahme der uterinen Gewebeproben	23
5.3.3	Transplantation der uterinen Gewebeproben	24
5.4	Messung des Volumens der Endometrioseherde mittels hochauflösendem Ultraschall	25
5.5	Messung der Größe der Endometrioseherde mittels digitalem Messschieber	26
5.6	Histologie und Immunhistochemie	27
5.6.1	HE-Färbung	27
5.6.2	CD31-Färbung	27
5.6.3	Ki67-Färbung	27
5.6.4	Ki67/CD31-Doppelfärbung	28
5.7	Western Blot	28
5.8	Experimentelles Protokoll	30
5.8.1	ES	30
5.8.2	I3C	32
5.9	Statistik	33
6	Ergebnisse	34

6.1	Wirkung von ES auf die Endometrioseherde	34
6.1.1	Dosierung	34
6.1.2	Wachstum der Endometrioseherde	34
6.1.3	Vaskularisierung der Endometrioseherde	36
6.1.4	Zellproliferation der Endometrioseherde	37
6.1.5	Western Blot-Analysen der Endometrioseherde	37
6.1.6	Wirkung auf Ovarien und Uteri	39
6.2	Wirkung von I3C auf die Endometrioseherde	40
6.2.1	Dosierung	40
6.2.2	Wachstum der Endometrioseherde	40
6.2.3	Vaskularisierung der Endometrioseherde	42
6.2.4	Zellproliferation der Endometrioseherde	43
6.2.5	Ki67/CD31-Doppelfärbung der Endometrioseherde	43
6.2.6	Western Blot-Analysen der Endometrioseherde	44
6.2.7	Wirkung auf Ovarien und Uteri	45
6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
7	Diskussion	49
7.1	Diskussion von Material und Methoden	49
7.1.1	Tierexperimentelle Endometriosemodelle	49
7.1.2	Ultraschall-Analyse	52
7.2	Diskussion der Ergebnisse	54
7.2.1	ES	54
7.2.2	I3C	58
8	Literaturverzeichnis	63
9	Danksagung	84
10	Lebenslauf	85
11	Publikation	86

Abkürzungsverzeichnis

AFS	American Fertility Society
AKT	Proteinkinase B
ANOVA	analysis of variance
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften

Bcl	B-cell lymphoma
------------	-----------------

CAM	Chorioallantoismembran
Casp	Caspase
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
COX	Cyclooxygenase
CT	5,6,11,12,17,18-Hexahydro-cyclononan-triindol

DIM	3,3'-Diindolylmethan
------------	----------------------

EEC	Endoscopic Endometriosis Classification
EFI	Endometriosis Fertility Index
EGF	epidermal growth factor
EPO	Erythropoietin
ER	Östrogenrezeptor
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ES	Ellagsäure

FGF	fibroblast growth factor
FSH	follikelstimulierendes Hormon

GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
-------------	-------------------------------

HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	hepatocyte growth factor
HI-IM	1-(3-Hydroxymethyl)-indolyl-3-indolylmethan

IκB	Inhibitor- κ B
I3C	Indol-3-Carbinol
ICZ	Indolylcarbazol
IGF	insulin-like growth factor

IL	Interleukin
LDL	low density lipoprotein
LH	luteinisierendes Hormon
LT	2-(Indol-3-ylmethyl)-3,3'-diindolylmethan
LUNA	laparoscopic uterine nerve ablation
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSAID	nicht steroidale Antiphlogistika
OH-Radikal	Hydroxyl-Radikal
pAKT	phosphorylated protein kinase B
PDGF	platelet-derived growth factor
pERK	phosphorylated extracellular-signal regulated kinase
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PSN	präsakrale Neurektomie
rASRM	revised American Society for Reproductive Medicine
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SERM	selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VLDL	very low density lipoprotein

1 Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine hormonabhängige Erkrankung, bei der sich Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) außerhalb der Gebärmutterhöhle (Cavum uteri) befindet. Häufige Lokalisationen sind hierbei das Peritoneum im kleinen Becken, die Haltebänder der Gebärmutter, die Eierstöcke (Ovarien) und der Douglasraum. Je nach Lokalisation leiden die betroffenen Patientinnen an unterschiedlichen Beschwerden. Mitunter können sie auch asymptomatisch sein. Leitsymptome sind eine schmerzhafte Menstruation (Dysmenorrhö), Zyklusanomalien, wie Menorrhagie und Hypermenorrhö, Schmerzen beim Geschlechtsverkehr (Dyspareunie) und vor allem chronische Unterbauchschmerzen. Oftmals geht eine Infertilität mit der Erkrankung einher. Aufgrund des Einflusses von Östrogen auf das hormonsensitive Endometriumgewebe manifestieren sich die Beschwerden hauptsächlich bei Frauen im gebärfähigen Alter. Hohe Prävalenzen finden sich mit 25-50% bei infertilen Frauen, wobei von einer weltweiten Prävalenz von 6-10% ausgegangen wird. Ätiologisch betrachtet gibt es verschiedene Theorien, welche die Entstehung einer Endometriose erklären. Die geläufigste Theorie stammt dabei von Sampson. Demnach wird durch retrograde Menstruation das Endometriumgewebe durch die Eileiter (Tuben) in die Bauchhöhle transportiert und wächst dort an.

Nach neuesten Erkenntnissen sind hormonelle, immunologische und entzündliche Prozesse in der Pathogenese der Endometriose von großer Bedeutung. Entsprechend weist sie Gemeinsamkeiten zu Tumorerkrankungen auf, obwohl sie eine benigne Erkrankung ist. Ein entscheidender Prozess ist das Wachstum von Gewebe (Proliferation) in Verbindung mit der Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese), denn für die Proliferation ist eine Versorgung mit Nährstoffen über die Blutgefäße essenziell. Somit konzentriert sich die Endometriose-Forschung in den letzten Jahren zunehmend auf Behandlungsmöglichkeiten, welche anti-angiogene und anti-proliferative Therapieansätze beinhalten. Bereits vorhandene anti-angiogene Medikamente, die auch zur onkologischen Behandlung eingesetzt werden, weisen allerdings erhebliche Nebenwirkungen auf und können die weiblichen Reproduktionsorgane stark beeinträchtigen. Ein Fokus liegt daher auf Phytosubstanzen, welche die proliferativen und angiogenen Signalwege signifikant hemmen können und meist besser verträglich sind.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkungen der Phytosubstanzen Ellagsäure (ES) und Indol-3-Carbinol (I3C) auf das Wachstum und die Angiogenese von Endometrioseherden im Mausmodell zu untersuchen. Hierzu wurden uterine Gewebeproben aus Spendermäusen syngene in die Bauchhöhle von BALB/c-Mäusen transplantiert. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes erhielten die Tiere täglich eine intragastrale Substanzapplikation. Die Wirkung der Phytosubstanzen auf die Endometrioseherde wurde jeweils in zwei Experimenten mit einem Untersuchungszeitraum von 7 und 28 Tagen analysiert. Über einen Zeitraum von 28 Tagen wurde einmal wöchentlich die Größenent-

wicklung der Endometrioseherde sonographisch analysiert. Danach wurden die Herde exzidiert und für weitere histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen aufbereitet. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen ermöglichten dabei die Beurteilung der Gewebemorphologie. Mittels cluster of differentiation (CD)31-Färbung wurde die Blutgefäßdichte der Endometrioseherde bestimmt. Zusätzliche Ki67-Färbungen dienten der Quantifizierung proliferierender Stroma- und Drüsenzellen und Ki67/CD31-Doppelfärbungen der Bestimmung proliferierender Endothelzellen in den Endometrioseherden. Zur Beurteilung von anti-angiogenen, anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Effekten wurde außerdem die Expression verschiedener Proteine mittels Western Blot bestimmt.

In einem ersten Studienabschnitt wurde die Wirkung von ES auf das transplantierte Uterusgewebe untersucht. Hierbei zeigte sich eine verringerte Wachstumsrate der induzierten Endometrioseherde nach 21 Tagen im Ultraschall. Zurückzuführen ist dies auf eine Hemmung der stromalen Proliferation nach 7 Tagen und eine Tendenz zur Inhibition der Angiogenese nach 28 Tagen. Es konnte dabei eine erhöhte Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)2 in den ES-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Dies kann als negative Rückkopplung des Gewebes auf die Unterdrückung der Angiogenese durch ES gedeutet werden. Des Weiteren ist es denkbar, dass ES die Apoptose förderte und somit zur Wachstumshemmung der Endometrioseherde beitrug, da eine erhöhte Expression von nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in den ES-behandelten Tieren nachgewiesen wurde.

In einem zweiten Studienabschnitt wurde die Wirkung von I3C auf das transplantierte Uterusgewebe untersucht. Hierbei konnte ebenfalls eine frühe Hemmung der Proliferation stromaler Endometriumzellen an Tag 7 festgestellt werden. Des Weiteren inhibierte I3C an Tag 7 die endotheliale Zellproliferation, was folglich zu einer geringeren Gefäßdichte an Tag 28 führte. Als anti-proliferativer Wirkmechanismus konnte hierbei die Hemmung des phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Signalweges durch I3C nachgewiesen werden. Dieser Signalweg ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation. Des Weiteren wurde in Western Blot-Analysen sowohl eine verringerte Expression von VEGFR2 als auch des nachgeschalteten Targets phosphorylated extracellular-signal regulated kinase (pERK) in I3C-behandelten Endometrioseherden gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, dass I3C ein wirksamer Inhibitor dieses Signalweges ist, welcher bekanntermaßen die Angiogenese in Endometrioseherden reguliert.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass ES und I3C die Größenprogredienz von Endometrioseherden *in vivo* hemmen, indem beide Substanzen die Zellproliferation und Angiogenese über unterschiedliche Mechanismen inhibieren. Somit stellen beide Substanzen vielversprechende Kandidaten zur zukünftigen Behandlung der Endometriose dar.

2 Summary

Endometriosis is a hormone-dependent disease, in which endometrial tissue (endometrium) is found outside the uterine cavity (cavum uteri). Common localizations are the peritoneum in the pelvis, the ligaments of the uterus, the ovaries and the pouch of Douglas. The symptoms vary depending on the localization. Sometimes patients may also be asymptomatic. However, the main symptoms are painful menstruation (dysmenorrhea), cycle abnormalities, such as menorrhagia and hypermenorrhea, pain during intercourse (dyspareunia), infertility and, above all, chronic pelvic pain. Due to the influence of estrogens on the hormone-sensitive endometrial tissue, the symptoms are mainly found in women of childbearing age. High prevalence rates of 25-50% are found in infertile women, assuming a worldwide prevalence of 6-10%. From an etiological point of view, there are various theories that can be responsible for the development of the disease. The most common theory is from Sampson. According to his theory, a retrograde menstruation is suspected, during which endometrial cells are carried along the fallopian tubes into the abdominal cavity, where they start to grow.

According to the latest findings, hormonal, immunological and inflammatory processes are of major importance in the pathogenesis of endometriosis. Therefore, it shares similarities to the development and progression of tumor diseases, although it represents a benign disease. A crucial process is the growth of tissue (proliferation) in connection with the formation of new blood vessels (angiogenesis), because the supply of nutrients via blood vessels is essential for proliferation. Thus, in recent years, endometriosis research has increasingly focused on treatment options that include anti-angiogenic and anti-proliferative therapeutic approaches. However, existing anti-angiogenic drugs, which are also used for oncological treatment, have considerable side effects and can strongly influence the female reproductive organs. This problem may be overcome by the use of phytochemicals, which can significantly suppress proliferative and angiogenic signaling pathways and are usually better tolerated in terms of their side effects.

Therefore, the aim of this thesis was to investigate the effects of the phytochemicals ellagic acid (ES) and indole-3-carbinol (I3C) on the growth and angiogenesis of endometriotic lesions in a mouse model. For this purpose, uterine tissue samples were syngeneically transplanted into the abdominal cavity of BALB/c mice. During the entire study period, the animals received a daily intragastric application of the compounds. Over a period of 28 days, the size of the newly developing endometriotic lesions was analyzed sonographically once a week. At the end of the experiments, tissue samples were excised and further processed for histological, immunohistochemical and molecular biological investigations. Hematoxylin-eosin (HE) staining enabled the analysis of tissue morphology. By means of cluster of differentiation (CD)31 stainings the microvessel density of endometriotic lesions was

assessed. In addition Ki67 stainings were used to quantify proliferating stromal and glandular cells and Ki67/CD31 double stainings to determine proliferating endothelial cells within the lesions. For the assessment of anti-angiogenic, anti-inflammatory or anti-proliferative effects, the expression of various proteins was determined by means of Western blot.

In the first section of this thesis, the effect of ES on the transplanted uterine tissue samples was examined. After 21 days, a reduced growth rate of the induced endometriotic lesions was detected by means of ultrasound. This was due to the inhibition of stromal proliferation after 7 days and a tendency towards the suppression of angiogenesis after 28 days. An increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)2 was detected in animals treated with ES. This may be interpreted as a negative feedback loop of the tissue as reaction to the suppression of angiogenesis by ES. Furthermore, it is conceivable that ES promotes apoptosis by upregulating the expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and thus, contributes to the growth inhibition of endometriotic lesions, as an increased expression of NF- κ B was detected in ES-treated animals.

In the second section of this thesis, the effect of I3C on the transplanted uterine tissue samples was investigated. An early inhibition of the proliferation of stromal endometrial cells was found on day 7. Furthermore, I3C inhibited the proliferation of endothelial cells on day 7, which resulted in a lower microvessel density on day 28. Two different signaling pathways can be considered as a possible anti-proliferative mechanism of action of I3C. On the one hand, I3C inhibits the PI3K signaling pathway and on the other hand, I3C downregulates VEGFR2, whereby the extracellular-signal regulated kinase (ERK) signaling pathway is also inhibited.

These findings demonstrate for the first time that ES and I3C reduce the growth of endometriotic lesions *in vivo*, because both substances inhibit proliferation and angiogenesis via different mechanisms. Accordingly, they represent promising candidates for the future treatment of endometriosis.

3 Einleitung

3.1 Endometriose

3.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Endometriose ist eine hormonabhängige, gynäkologische Erkrankung, welche gehäuft bei Frauen im gebärfähigen Alter auftritt. Sie basiert auf dem Vorkommen von Endometriumgewebe außerhalb der Gebärmutterhöhle, das sich vorwiegend in der Bauchhöhle ansammelt [AWMF, 2013]. Dieses ektope Endometriumgewebe wird als Endometrioseherd bezeichnet. Die Endometrioseherde führen dabei zu einer chronischen Entzündungsreaktion [Weyerstahl und Stauber, 2007]. Weltweit liegt die Prävalenz der Erkrankung bei 6-10%, wobei von allen infertilen Frauen 25-50% betroffen sind [Bullett et al., 2010]. Allerdings wird aufgrund häufiger asymptomatischer Verläufe eine viel höhere Prävalenz vermutet [Rawson et al., 1991]. Die weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron tragen zum Progress der Endometrioseherde bei [Dizerega et al., 1980]. Jenseits des Klimakteriums sowie bei präpubertären Frauen tritt die Endometriose daher eher seltener auf [Weyerstahl und Stauber, 2007]. Einen fördernden Einfluss auf die Erkrankung haben Risikofaktoren, wie z. B. eine frühe Menarche, eine kürzere Zykluslänge (< 27 Tage), ein verlängerter Menstruationsfluss sowie erhöhter Koffein- und Alkoholkonsum [Cramer und Missmer, 2002]. Außerdem tritt die Endometriose auch gehäuft bei verwandten Personen und Asiatinnen auf, dafür aber weniger bei dunkelhäutigen Frauen. Dahingegen sollen eine erhöhte Parität und eine Verringerung der Östrogenspiegel, z. B. durch regelmäßiges körperliches Training, das Risiko, an einer Endometriose zu erkranken, reduzieren [Cramer und Missmer, 2002]. Die Behandlung der Endometriose stellt eine große wirtschaftliche Herausforderung dar. Angesichts von 5-Jahres-Rezidivraten von 40-50% sind vor allem die langjährige Behandlungsdauer und die damit verbundenen Kosten ein wichtiger wirtschaftlicher Aspekt [Guo, 2009].

3.1.2 Einteilung und Symptomatik

Die Einteilung der Endometriose erfolgt in Abhängigkeit verschiedener Kriterien. Anhand der Lokalisation unterscheidet man zwischen einer Endometriosis genitalis interna, Endometriosis genitalis externa und Endometriosis extragenitalis [Albrecht, 1955]. Die Endometriosis genitalis interna wird auch als Adenomyosis uteri bezeichnet und bezieht sich nur auf Endometriumgewebe im Myometrium und im Abgangsbereich der Tuben. Die Endometriosis genitalis externa beschreibt Endometrioseherde in den weiblichen Geschlechtsorganen, wie Ovarien, Tuben, Vagina und Vulva, ebenso wie in den Sakrouterinbändern, im Perineum, im Douglas-Raum und dem Peritoneum (Abb. 1). Alle weiteren Lokalisationen der Endometriose, wie beispielsweise in Harnblase, Darm mit Appendix vermiformis,

Bauchnabel, Retroperitoneum, Zwerchfell, Lunge, Muskel und Gehirn, werden unter dem Begriff der Endometriosis extragenitalis zusammengefasst [Suginami, 1991; Sarma et al., 2004; Saberi et al., 2009]. Die häufigsten Lokalisationen finden sich mit 67% im Ovar, 46% in den Sakrouterinbändern, 32% in der Fossa ovarica, 30% im Douglas-Raum und 21% an der Harnblase [Audebert et al., 2018].

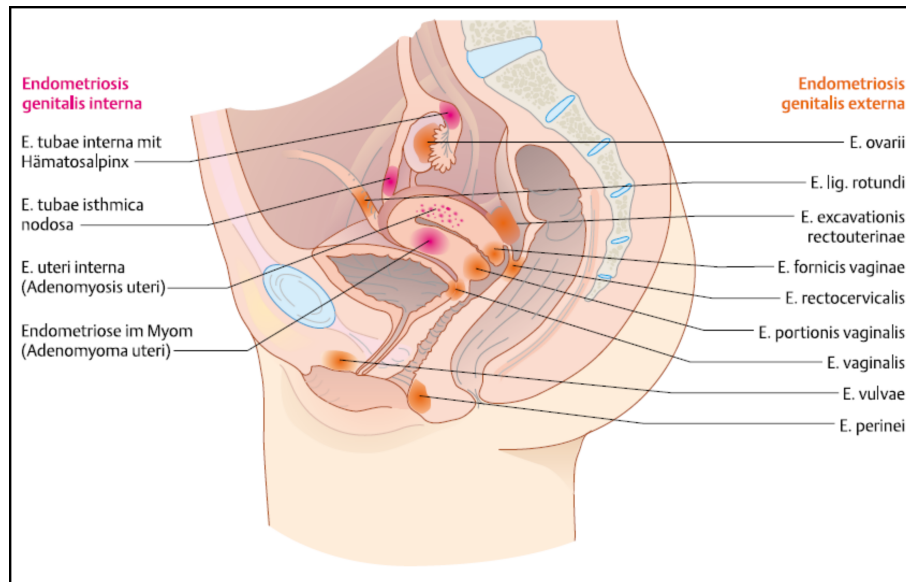


Abbildung 1: Mögliche Lokalisationen von Endometrioseherden [Breckwoldt et al., 2008].

Neben der Einteilung anhand der Lokalisation lässt sich die Endometriose auch in eine oberflächlich-peritoneale, eine ovarielle und eine tief-infiltrierende Endometriose gliedern. Zudem besteht die Möglichkeit, Endometrioseherde nach ihrer Farbe und Aktivität in rote, braunschwarze und weiße Herde oder gemischte Erscheinungsformen einzuteilen [AWMF, 2013]. Gut vaskularisierte Endometrioseherde erscheinen makroskopisch rot. Im Gegenteil dazu stellt eine braunschwarze Läsion eine inaktive Form dar, bei der vor allem hämosiderintragende Makrophagen zum Erscheinungsbild beitragen. Die nachfolgende Fibrose aufgrund der entzündlichen Reaktion führt schließlich zu weißlich aussehenden, vernarbten Herden [Donnez et al., 2013]. Zu dem typischen Erscheinungsbild einer Endometriose gehören auch die bräunlichen Teer-/Schokoladenzysten im Ovar, welche Menstrualblut enthalten und sich sonographisch als homogene Zysten darstellen [Kupfer et al., 1992].

Generell können Patientinnen asymptomatisch sein oder sehr unspezifische Symptome aufweisen. Dadurch wird die Diagnose der Endometriose häufig erschwert, sodass Jahre zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der endgültigen Diagnosestellung vergehen können [Hadfield et al., 1996]. Die Beschwerden korrelieren dabei nicht mit dem Ausprägungsgrad der Endometriose, sondern sind eher von der Lokalisation der Endometrioseherde abhängig [Gruppo Italiano per lo Studio dell' Endometriosi, 2001]. Kennzeichnende Symptome dieser Erkrankung sind Zyklusanomalien, wie Menorrhagie und Hypermenorrhö, sowie die Dysmenorrhö, welche mit einer Häufigkeit von 60-88%

ein Leitsymptom ist [Ballard et al., 2008; Ebert, 2008]. Zusätzlich leiden die Patientinnen meist an zyklusunabhängigen Beschwerden, wie z. B. chronischen Unterbauchschmerzen, Gliederschmerzen oder Dysurie [Stratton und Berkley, 2011]. In Assoziation zur Endometriose lässt sich auch häufig eine Infertilität sowie ein erhöhtes Risiko für eine Extrauterin gravidität als Folge einer gestörten Ovarialfunktion feststellen [Jarrell, 2004; Rana et al., 2013; Donnez et al., 2016]. Charakteristisch ist auch die Dyspareunie, welche auf die Reizung von Nervenfasern, die in den Endometrioseherden nachgewiesen werden können, zurückzuführen ist [Mechsner et al., 2007]. Ab der Menopause bessern sich die Beschwerden oftmals, da die Endometrioseherde aufgrund des Östrogenmangels weniger aktiv sind [Cumiskey et al., 2008].

3.1.3 Diagnostik und Klassifikation

Trotz intensiver Suche nach neuen Biomarkern mit besonderem Fokus auf verschiedene Zytokine existiert bisher keine eindeutige, nichtinvasive Diagnostik der Endometriose [Coutinho et al., 2019]. Je nach Lokalisation lässt sich ein Herd mittels Ultraschall (Abb. 2A) oder in der Magnetresonanztomographie (MRT) nachweisen. Für die eindeutige Bestimmung ist der histologische Nachweis aber unabdingbar, wofür eine Biopsie während einer Laparoskopie oder Laparotomie notwendig ist (Abb. 2B) [Walter et al., 2001; Stratton et al., 2003].

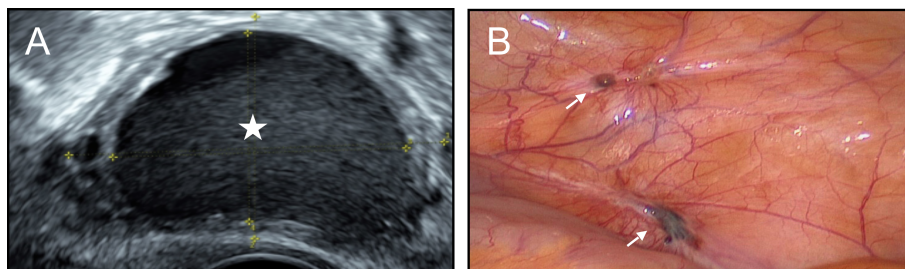


Abbildung 2: Erscheinungsbild verschiedener Endometrioseherde. **A:** Sonographische Darstellung einer Endometriose des Ovars (Stern) [Montanari et al., 2020]. **B:** Laparoskopische Aufnahme von Endometrioseherden am Peritoneum (Pfeile) [Juhasz-Böss et al., 2014].

Die operative Untersuchung ist zudem eine Voraussetzung für eine korrekte Stadieneinteilung dieses Krankheitsbildes. Dazu werden vier Klassifikationssysteme unterschieden. Die international am häufigsten verwendete Stadieneinteilung ist die der revised American Society for Reproductive Medicine (rASRM), früher American Fertility Society (AFS) genannt. Mit Hilfe eines Punktesystems werden hierbei die Anzahl, Größe, Lokalisation und Verwachsungen der Endometrioseherde in die Stadien I-IV eingeteilt [American Society for Reproductive Medicine, 1997]. Jedoch berücksichtigt diese Klassifikation nicht die tief-infiltrierenden Endometrioseherde, weshalb bei diesen Formen auf den ENZIAN-Score zurückgegriffen wird. Dieser wird ebenfalls in vier Stadien eingeteilt, fokussiert jedoch hauptsächlich auf die retroperitoneale Endometriose [Tuttles et al., 2005]. Der Endometriosis Fertility Index (EFI) beinhaltet eine genauere Voraussage zur Schwangerschaftsrate, wenn sich unfruchtbare

Frauen mit Endometriose einer chirurgischen Operation unterziehen [Adamson und Pasta, 2010]. Zusätzlich gibt es noch die vereinfachte Endometrioseeinteilung nach der Endoscopic Endometriosis Classification (EEC), bei dem die Stadieneinteilung anhand des schwerwiegendsten endoskopischen Befundes erfolgt [Steck et al., 2004].

3.1.4 Ätiologie

Das Krankheitsbild der Endometriose wurde erstmals 1690 von dem deutschen Mediziner Daniel Shroen erwähnt, wobei er von „Geschwüren“ berichtete, die sich zwischen Blase, Darm und den Uterusbändern verteilten [Knapp, 1999]. Ende des 19. Jahrhunderts wurden dann derartige Geschwüre von Thomas Cullen und Carl von Rokitansky als eine Form der „Adenomyosis“ bezeichnet, ebenso wie die von Friedrich von Recklinghausen gefolgerte Theorie zur Entstehung der Adenomyome aus „Überbleibseln des Wolffischen Körpers“ [Von Rokitansky, 1860; Cullen, 1896; Von Recklinghausen, 1896]. Weitere Ausführungen folgten 1903, in denen Robert Meyer von einer Narbenendometriose sowie einer Endometriose im Dickdarm und in einem Lymphknoten berichtete [Meyer, 1919]. Erst im Jahr 1925 etablierte Oskar Frankl den Begriff der „Adenomyosis Uteri“ und grenzte somit die Adenomyose von der klassischen Endometriose ab [Benagiano et al., 2014]. Bisher ist die genaue Ursache der Endometriose noch nicht ausreichend geklärt. Über die Jahre wurden jedoch verschiedene Theorien zur Entstehung postuliert.

So stellte bereits 1899 William W. Russel die sogenannte *Embryonalrest-Theorie* auf. Darin vermutet er, dass die Entdeckung von endometrialem Gewebe in den Ovarien auf dem Vorhandensein von untypischen Anteilen des Müller-Gangs beruht [Russel, 1899]. Ähnliche Überlegungen kommen auch bei der *Coelom-Metaplasie-Theorie* nach Robert Meyer zum Tragen. Diese bezieht sich auf die embryonalen Zellen des Coelom-Epithels, welche zur späteren Tunica Serosa der Pleura-/Peritonealhöhle differenzieren. Infolge verschiedener Stimuli, beispielsweise hormoneller Faktoren oder einem inflammatorischen Prozess, könne dieses Epithel laut Meyer zu endometrialen Zellen metaplasieren [Meyer, 1919; Samartzis et al., 2012]. Die *Lymphatische Metastasierung* nach Halban wurde 1925 etabliert. Diese Theorie besagt, dass das Endometrium infolge lymphogener Streuung zu den jeweiligen Organen gelangt [Halban, 1925]. Javert entwickelte außerdem die sogenannte *Kombinationstheorie*, bei der es sich um einen Zusammenschluss aus einigen der oben genannten Theorien handelt. Hierbei soll sowohl die lymphatische und hämatogene Streuung als auch die direkte retrograde Exfoliation endometrialer Zellen in die Bauchhöhle zur Ausbreitung des endometrialen Gewebes beitragen [Javert, 1949]. Aus dem Jahr 1955 stammt die *Induktionstheorie* von Levander. Diese besagt, dass chemische Botenstoffe aus dem Endometrium durch verschiedene Umweltfaktoren undifferenzierte Zellen zur Bildung von Endometrium aktivieren können [Levander und Normann, 1955]. Die *Endometriotic-Disease-Theorie* nach Koninckx postuliert, dass vor allem das inflammatorische Milieu,

welches in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen nachweisbar ist, fördernd für die Entstehung von Endometrioseherden ist [Koninckx et al., 1998]. Nachdem in einer Studie eine Überexpression des Enzyms Aromatase in Endometrioseherden gefunden wurde, wurde auch das *Aromatase-Konzept* nach Bulun aufgestellt. Dieses hebt hervor, dass es vor allem infolge der Aromatase-Überexpression zur lokal verstärkten Östrogensynthese und dadurch zu einer vermehrten Zellproliferation innerhalb der Endometrioseherde kommt [Bulun et al., 2004]. Auf Grundlage der kurz zuvor veröffentlichten *Archimetratheorie*, bei der sich endometriale Zellen aufgrund einer Dysfunktion der Archimetra aus der Basalschicht herauslösen und außerhalb des Cavum uteri anwachsen, wurde die *Tissue Injury And Repair-Theorie (TIAR)* nach Leyendecker entwickelt [Leyendecker et al., 1998]. Basierend auf den autonomen Muskelkontraktionen des Uterus vermutete Leyendecker, dass die Hyperperistaltik der Uterusmuskulatur Mikrotraumen verursacht, aus denen herausgelöste Endometriumzellen an andere Lokalisationen verschleppt werden. Infolge physiologischer Reparationsmechanismen und lokal erhöhten Östrogenspiegeln kommt es dort zu einem infiltrierenden Wachstum der Zellen mit chronischer Inflammation [Leyendecker et al., 2009].

Die heutzutage wohl gängigste und weltweit am meisten verbreitete Theorie wurde 1927 als *Implantationstheorie* von Sampson aufgestellt. Hierbei postulierte er, dass abgestoßenes Endometrium infolge einer retrograden Menstruation über die Tuben in den Bauchraum gelangt und schließlich an verschiedenen Stellen der Bauchhöhle adhäriert [Sampson, 1927]. Für diese Hypothese sprechen mehrere Beobachtungen. Zum einen konnte Menstruationsblut bei Patientinnen mit Endometriose in der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen werden [Halme et al., 1984]. Zum anderen entspricht die anatomische Verteilung der Endometrioseherde in Bezug auf deren Prädispositionsstellen dem retrograden Menstruationsfluss. Weiterhin ist eine Endometriose bei Frauen mit Uterusanomalien häufiger, was die Vermutung nahelegt, dass das Menstruationsblut in diesen Fällen schlecht vaginal abfließen kann und sich daher eher den retrograden Weg über die Tuben sucht [Burney und Giudice, 2012].

3.1.5 Pathogenese

Ausgehend von Sampsons *Implantationstheorie* lässt sich bei ca. 90% aller Frauen Menstruationsblut im Peritonealraum feststellen [Halme et al., 1984]. Jedoch entwickelt nicht jede Frau eine Endometriose. Es wird daher angenommen, dass bei den meisten Frauen das Immunsystem mit seinen zellulären peritonealen Abwehrmechanismen das ektope Endometriumgewebe im Menstrualblut entfernen kann [Koninckx et al., 1998]. Bei einer herabgesetzten Immunität in Form einer reduzierten Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und einer verminderten Anzahl an T-Zellen in der Peritonealflüssigkeit ist dies jedoch möglicherweise beeinträchtigt [Steele et al., 1984; Oosterlynck et al., 1991]. Hieraus resultiert eine chronische Inflammation mit einer erhöhten Anzahl an Makrophagen und erhöhten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem tumor necrosis

factor (TNF)- α [Badawy et al., 1984; Halme, 1989].

Zusätzlich ist der Eisenstoffwechsel bei Patientinnen mit Endometriose verändert. So konnten ein Eisenüberschuss und höhere Hämoglobinkonzentrationen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen nachgewiesen werden [Van Langendonck et al., 2002]. Eisen ist ein Induktor für oxidativen Stress, welcher durch ein Ungleichgewicht von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Antioxidantien entsteht und wiederum eine Inflammation begünstigt. Dadurch wird der Progress des Krankheitsbildes gefördert [Scutiero et al., 2017].

Des Weiteren lassen sich im ektopen Endometrium generell unterschiedliche Isoformen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren als im eutopen Endometrium nachweisen [Brandenberger et al., 1999; Attia et al., 2000]. So finden sich in Endometrioseherden oftmals höhere Expressionen der Östrogenrezeptoren (ER) β sowie eine Aromatase-Überexpression, infolgedessen sich lokal erhöhte Östrogenkonzentrationen ergeben, die ebenfalls das Wachstum des ektopen Endometriums fördern [Zeitoun et al., 1998; Bulun et al., 2012]. Aus diesem Grund ist möglicherweise auch das Risiko einer malignen Entartung bei Frauen mit Endometriose erhöht [Kobayashi et al., 2011].

Das Wachstum von Endometrioseherden ist ein komplexer Prozess, der vielen molekularen Mechanismen unterliegt und durch verschiedene Faktoren gefördert werden kann. Neben der chronischen Inflammation und den lokal erhöhten ER-Spiegeln ist vor allem die Angiogenese von zentraler Bedeutung für das Wachstum der Endometrioseherde. Angiogenese bezeichnet die Entwicklung neuer Blutgefäße durch Sprossung aus bereits bestehenden Blutgefäßen und ist für die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen essenziell [Adair und Montani, 2010]. In Endometrioseherden wird die Angiogenese durch pro- und anti-angiogene Faktoren reguliert [Carmeliet, 2000]. Nach Verschleppung von Endometriumgewebe in die Bauchhöhle kommt es oft zur chronischen Inflammation durch aktivierte peritoneale Makrophagen. Diese schütten proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 β aus, wodurch Stromazellen des Endometriums zur Expression angiogener Wachstumsfaktoren angeregt werden [Chung und Han, 2022]. Einer der bedeutendsten Faktoren ist vascular endothelial growth factor (VEGF). Dieser wird vorwiegend durch die Stromazellen des Endometriumgewebes sezerniert und bindet an vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)2 auf den Endothelzellen, infolgedessen intrazelluläre pro-angiogene Signalwege stimuliert werden [Laschke et al., 2006b]. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass bei Endometriose-Patientinnen erhöhte VEGF-Konzentrationen in der Peritonealflüssigkeit sowie im ektopen Endometriumgewebe vorhanden sind [Donnez et al., 1998]. Weitere angiogene Wachstumsfaktoren mit einem signifikanten Einfluss auf die Endometriose sind fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF)- β , platelet-derived growth factor (PDGF), hepatocyte growth factor (HGF), Erythropoietin (EPO) und insulin-like growth factor (IGF)-1 [Surrey und Halme, 1991; Ferriani et al., 1993; Küpker et al., 1998; Matsuzaki et al., 2001;

Sokolov et al., 2005; Khan et al., 2006]. Die pro-angiogenen Signalwege bewirken schließlich eine Endothelzellproliferation und -migration. Dabei kommt es zu einer Auflösung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix bereits vorhandener Blutgefäße [Folkman, 1984]. Die Endothelzellen dieser Gefäße migrieren in das Interstitium, was zur Bildung von Gefäßsprossen führt. Die Endothelzellen hinter dem migrierenden Endothel der Sprossen proliferieren und führen so zu einer Verlängerung des Gefäßsprosses. Anschließend stabilisieren Perizyten die Wand des neu entstandenen Blutgefäßes [Laschke et al., 2006b; Wagener und Müller, 2010]. Eine Hemmung dieses angiogenen Prozesses stellt einen vielversprechenden Therapieansatz zur Behandlung der Endometriose dar.

3.1.6 Therapie

Nach den Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) richtet sich die Therapieempfehlung nach der Lokalisation der Endometriose [AWMF, 2013].

Zu Beginn der Therapie stehen an erster Stelle konservative bzw. pharmakologische Behandlungsansätze. So ist in der frühen Phase der Erkrankung meist die rein symptomatische Behandlung mit nicht steroidal Antiphlogistika (NSAID) die medikamentöse Therapie der ersten Wahl. Diese haben zwar keinen direkten Einfluss auf die Endometrioseherde, zeigen jedoch eine gute analgetische Wirkung bei Dysmenorrhö [Halis et al., 2006]. Eine Alternative bieten endokrine Therapieoptionen. Dazu zählen orale Kontrazeptiva, wie z. B. Dienogest oder Desogestrel, welche eine Suppression des Östrogenspiegels bewirken und so zu einer Wachstumshemmung der Endometrioseherde führen [Nothnick et al., 2010]. Östrogen-Gestagen-Präparate senken das Risiko einer proliferierenden Endometriose, in dem sie zu einem gleichbleibend niedrigen Östrogenspiegel beitragen [Hali et al., 2006]. Gestagene in Form der Minipille oder Hormonspirale können ebenso verabreicht werden. Diese bewirken eine Atrophie des Endometriums und eine Verdickung des Zervixsekrets, wobei sie die Ovulation in der Regel nicht verhindern [Fedele et al., 2001]. Eine weitere Therapieoption bieten die Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Agonisten, wie z. B. Buserelin oder Goserelin [Brown et al., 2010]. Hierbei werden durch eine Überstimulation der Hypophyse weniger follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) in die Blutbahn freigesetzt, wodurch die Ovarien weniger Östrogene sezernieren [Halis et al., 2006]. Als relevante Nebenwirkung dieser Präparate ist vor allem die Abnahme der Knochendichte zu erwähnen, weshalb zusätzlich eine Add-back Therapie erfolgen sollte, bei der niedrig dosierte Östrogene substituiert werden [Edmonds, 1996]. GnRH-Antagonisten, wie Cetrorelix, führten in ersten klinischen Studien ebenfalls zu einer Regression von Endometrioseherden und zeigten weniger Nebenwirkungen bei den Patientinnen [Küpker et al., 2002]. Eine früher sehr gängige Therapieform der Endometriose war das Testosteronpräparat Danazol. Es führte zu einer Atrophie des Endometriumgewebes bei Senkung des Östradiolspiegels und gleichzeitigem Anstieg des Testo-

steronspiegels [Floyd, 1980]. Aufgrund häufiger androgener Nebenwirkungen, wie Gewichtszunahme, Hirsutismus und Akne, ist die Anwendung dieses Präparates zunehmend in den Hintergrund gerückt [Farquhar, 2007].

Sollten die oben genannten medikamentösen Therapieformen erfolglos sein, folgt die operative, vorzugsweise laparoskopische, Entfernung der Endometrioseherde [AWMF, 2013]. Langfristig zeigt sich dabei ein verbessertes Therapieergebnis in Bezug auf die Schmerzen der Patientinnen [Jacobson et al., 2009]. Allerdings gewährleistet eine chirurgische Intervention keine absolute Beschwerdefreiheit, da hierdurch weitere Komplikationen, wie postoperative Verwachsungen oder Fisteln, entstehen können [Minelli et al., 2009]. Weitere mögliche Operationsstrategien, die vor allem der Schmerzlinderung dienen, sind die laparoscopic uterine nerve ablation (LUNA) oder die präsakrale Neurektomie (PSN) [Proctor et al., 2005]. Im Hinblick auf die dauerhaften Erfolge hat sich jedoch die Drei-Phasen-Therapie bewährt. Hierbei erfolgt eine initiale Laparoskopie mit daran anschließender drei- bis sechsmonatiger endokriner Therapie und finaler Re-Laparoskopie zur Endsanierung [Mettler und Schmutzler, 2007].

3.2 Forschung

In der Endometrioseforschung wird nach weiteren Therapieoptionen zur Behandlung der Erkrankung gesucht. So wurden in den letzten Jahren vermehrt Aromatase-Inhibitoren der 3. Generation in klinischen Studien getestet. Diese eignen sich vor allem bei älteren Patientinnen als gezielte Therapie, da das Enzym Aromatase größtenteils im Fettgewebe von postmenopausalen Frauen und in hohen Konzentrationen in ektopen Endometrioseherden zu finden ist [Slopien und Mczekalski, 2016]. Allerdings zeigen sich auch bei dieser Therapieform die typischen, durch Östrogenmangel hervorgerufenen Nebenwirkungen, wie beispielsweise die Abnahme der Knochendichte [Bulun et al., 2004]. Des Weiteren konnte in Tierversuchen bereits eine Größenreduktion von Endometrioseherden durch selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) erzielt werden. Je nachdem, welcher Generation der jeweilige SERM angehört, bindet dieser vermehrt an $ER\alpha$ oder $ER\beta$ und kann dadurch abhängig vom Zielgewebe entweder eine östrogene oder anti-östrogene Wirkung hervorrufen. Allerdings ist die Anwendung von SERM in klinischen Studien bislang noch wenig erforscht [Khine et al., 2018].

Aufgrund der Vielzahl an hormonellen Nebenwirkungen während einer endokrinen Therapie, die durch eine Verringerung des Östrogenserumspiegels ausgelöst werden, konzentriert sich die Forschung in den letzten Jahren vermehrt auf alternative Behandlungsmöglichkeiten. So befassen sich z. B. mehrere Studien mit Immunmodulatoren zur Behandlung der Endometriose [Kotlyar et al., 2019]. Hierzu zählen Lipoxin A4, Rapamycin und Pentoxifyllin [Laschke et al., 2006a; Vlahos et al., 2010; Xu et al., 2012]. Weiterhin wurde bereits für Wachstumsfaktor-Inhibitoren, wie z. B. SU6668 und Beva-

cizumab, in tierexperimentellen Studien untersucht, ob sie einen anti-angiogenen Effekt auf Endometrioseherde ausüben [Laschke et al., 2006b; Ricci et al., 2011]. Weitere Studien analysierten den Einfluss von Endostatin, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Inhibitoren, wie Simvastatin, und Dopaminagonisten, wie Cabergolin, auf die Entwicklung von Endometrioseherden [Nap et al., 2004; Bruner-Tran et al., 2009; Delgado-Rosas et al., 2011; Feng et al., 2012]. Auch Inhibitoren der Proteinkinase CK2, von Enzymen, wie Cyclooxygenase (COX)-2, und Inhibitoren des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors zeigten in tierexperimentellen Studien bereits eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von chirurgisch-induzierten Endometrioseherden in Nagetieren [Laschke et al., 2007; Olivares et al., 2011; Feng et al., 2012]. Viele der genannten Substanzen haben eine anti-angiogene Wirkung. Allerdings kann diese anti-angiogene Wirkung das weibliche Fortpflanzungssystem stören, da die Bildung neuer Blutgefäße als physiologischer Prozess beim Erwachsenen hauptsächlich in den weiblichen Reproduktionsorganen stattfindet [Reynolds et al., 1992]. Daher fokussiert sich die Forschung vermehrt auf Alternativen, die ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen. Hierzu wurden in den letzten Jahren vermehrt pflanzliche Extrakte und einzelne Phytosubstanzen untersucht. Diese sind gut verträglich und in der Regel auch nebenwirkungsarm. Vor allem der anti-inflammatorische und analgetische Wirkmechanismus pflanzlicher Arzneimittel ist in Bezug auf die Endometriose von hohem Interesse [Wieser et al., 2007]. Beispielsweise übt das Polyphenol Resveratrol eine inhibitorische Wirkung auf die Expression angiogener Wachstumsfaktoren aus und hemmt *in vitro* die Proliferation von Endometriosezellen [Bruner-Tran et al., 2011]. Entsprechend konnte Resveratrol bereits in ersten klinischen Studien in Kombination mit oralen Kontrazeptiva erfolgreich gegen Dysmenorrhoe eingesetzt werden [Maia et al., 2012]. Ebenfalls von hohem therapeutischen Potenzial ist das Flavonoid Epigallocatechin-3-gallat, welches in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Endometriosemodellen anti-angiogen wirkte, indem es die Expression von VEGF hemmte [Laschke et al., 2008]. Weitere Phytosubstanzen, wie Curcumin, Puerarin, Quercetin, Ginsenoside und 4-Hydroxybenzylalkohol, zeigten ebenfalls anti-angiogene, anti-inflammatorische oder anti-proliferative Effekte in tierexperimentellen Endometriosemodellen [Meresman et al., 2021]. Folglich konnte in diesen Experimenten bereits ein vermindertes Größenwachstum der Endometrioseherde durch die Applikation dieser Phytosubstanzen festgestellt werden. Daher wird der Einsatz dieser Substanzen in zukünftigen klinischen Studien an Endometriose-Patientinnen diskutiert [Meresman et al., 2021]. Auch Ellagsäure (ES) und Indol-3-Carbinol (I3C) gehören zu den Phytosubstanzen und sind bisher im Kontext der Endometriose *in vivo* wenig erforscht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss von ES und I3C auf die Entwicklung und Vaskularisierung von Endometrioseherden im Mausmodell zu untersuchen.

3.3 Substanzen

3.3.1 ES

ES (Abb. 3) ist ein Polyphenol und entsteht durch Hydrolyse von Ellagitanninen mittels Ellagitannin-Acylhydrolase. Ellagitannine sind eine der vier Hauptgruppen der Tannine, welche als phenolische Verbindungen in Pflanzen vorkommen. Dabei liegt ES in den Pflanzen sowohl in seiner freien Form als auch als Teil der Ellagitannine vor [Landete, 2011; Aguilar-Zárate et al., 2018]. ES findet man z. B. in Granatäpfeln, Kakis, Himbeeren, Erdbeeren, Pfirsichen, Pflaumen, Walnüssen und Mandeln, wobei ES auch in vielen Heilpflanzen, wie z. B. im Pflanzenextrakt des Blauen Eukalyptus (*Eucalyptus globulus*), nachweisbar ist [García-Niño und Zazueta, 2015; Derosa et al., 2016]. Bei dem Verzehr wird ES im oberen Gastrointestinaltrakt absorbiert, über einen First-Pass-Effekt zu Methyl-ester, Dimethylester und Glucuronide metabolisiert und schließlich über die Niere eliminiert [Kang et al., 2016].

Bestehend aus vier Hydroxylgruppen und zwei Lactonen als hydrophile Einheit sowie zwei Kohlenwasserstoffringen als lipophile Einheit ist ES ein Chromendionderivat und daher schlecht wasserlöslich. Allerdings ermöglichen diese Eigenschaften eine Wirkung als Antioxidans. ES eliminiert ROS und hemmt die pro-oxidative Wirkung von Metallen, wie Eisen, durch einen Chelatbildungsprozess. So werden freie Radikale von ES abgefangen und der oxidative Stress verringert [Ríos et al., 2018].

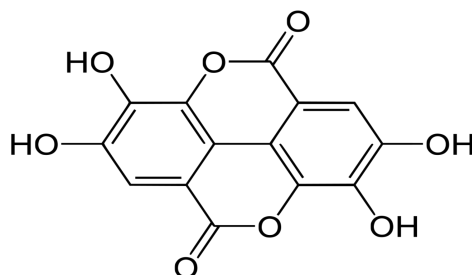


Abbildung 3: Strukturformel von ES.

Oxidativer Stress ist eng mit Inflammation verbunden [Biswas, 2016]. Bei der Entstehung inflammatorischer Prozesse ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B von großer Bedeutung. NF- κ B liegt im Zytosol ruhender Zellen oft in seiner inaktiven Form gebunden an Inhibitor- κ B ($I\kappa$ B)-Proteine vor [Büchel, 2021]. Oxidativer Stress oder inflammatorische Zytokine, wie IL-1 oder TNF- α , stimulieren die Aktivierung von NF- κ B. Dabei wird $I\kappa$ B phosphoryliert und degradiert, wodurch NF- κ B in den Zellkern transloziert und so die Transkription von Akute-Phase-Proteinen, weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α , IL-6, COX-2, oder Wachstumsfaktoren, wie VEGF und PDGF, induziert [Umesalma und Sudhandiran, 2010; Büchel, 2021]. Der Einfluss von ES auf NF- κ B wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass ES die Expression von NF- κ B

dosisabhängig hemmt. So wurde in einer *in vivo* Studie an Kolonkarzinomzellen in Ratten nachgewiesen, dass nach Behandlung der Tiere mit ES die Proteinexpression von NF- κ B in den Zellen reduziert wird. Erklärt wurde dieses Ergebnis damit, dass die Kolonkarzinomzellen mittels 1,2-Dimethylhydrazin induziert wurden, was zu erhöhten Expressionen von NF- κ B führte und so die Inflammation sowie oxidativen Stress begünstigte. Durch die anschließende Behandlung mit ES konnte die Expression von NF- κ B in den Zellen reduziert werden, da ES anti-oxidativ wirkt [Umesalma und Sudhandiran, 2010]. Auch in einer weiteren *in vivo* Studie an Ratten, welche einer Inflammation ausgesetzt wurden, konnte eine reduzierte Expression von NF- κ B nach Gabe von ES nachgewiesen werden [El-Shitany et al., 2014]. Allerdings zeigte eine andere *in vitro* Studie an Pankreaszellen, dass ES keinen Einfluss auf NF- κ B ausübt. Vermutet wurde hierbei, dass die Aktivierung von NF- κ B zell- und stimulusspezifisch ist, sodass ES nur während einer akuten Inflammation einhergehend mit oxidativem Stress hemmend auf die Expression von NF- κ B wirkt [Masamune et al., 2005]. Ebenso kontrovers wird der Einfluss von ES auf COX-2 diskutiert. In einer tierexperimentellen Studie konnte eine reduzierte COX-2-Expression im Kolongewebe von Tieren mit chronischer Colitis unter der Behandlung mit ES nachgewiesen werden [Derosa et al., 2016]. In einer anderen *in vivo* Studie an Mäusen, bei denen mittels Indomethacin gastroenterologische Ulzera induziert wurden, wurde jedoch eine erhöhte Expression von COX-2 nach Gabe von ES nachgewiesen, obwohl die Expression anderer pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF oder IL-6, durch die Behandlung mit ES reduziert war [Chatterjee et al., 2012]. In der beschriebenen Studie führte die erhöhte Expression von COX-2 zu einer vermehrten Stimulierung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, die zu einer vermehrten Angiogenese beitrugen und letztendlich die Heilung von gastroenterologischen Ulzera förderten [Chatterjee et al., 2012].

Neben anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften werden ES auch anti-atherogene und neuroprotektive Wirkungen zugeschrieben. So wirkt ES anti-hyperlipidämisch, indem es indirekt die Serumspiegel von Triglyceriden, Gesamtcholesterin und den Anteil von low density lipoprotein (LDL) und very low density lipoprotein (VLDL) verringert. Zudem zeigte ES auch leberprotektive Eigenschaften im Hinblick auf eine Reihe von Pharmaka, Toxinen und Viren. Dazu zählen beispielsweise Alkohol, Cisplatin, Cyclosporin, Rifampicin, Isoniazid, Quecksilber, Paracetamol sowie Hepatitis-B- und C-Viren [García-Niño und Zazueta, 2015; Salem et al., 2016]. Weiterhin konnte eine anti-hyperglykämische und anti-hypertensive Wirkung nachgewiesen werden. Daher ist ES auch von großem Interesse in Bezug auf Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Erkrankungen [Da Silva Pinto et al., 2010; Jordão et al., 2017].

In der vorliegenden Arbeit war insbesondere die Wirkung von ES auf das Zellwachstum von großem Interesse. In bisherigen Tumorstudien wurde durch die Gabe von ES eine signifikante Hemmung der Proliferation von Brust- und Endometriumkarzinomzellen erzielt [Chen et al., 2015; Abdelazeem et

al., 2017]. Dabei wurde die Proliferation der Brustkrebszellen mittels eines Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase bzw. G₂/M-Phase unterdrückt [Chen et al., 2015]. In einer kürzlich von Mc Cormack et al. [2020] publizierten *in vitro* Studie konnte ebenfalls ein hemmender Einfluss von ES auf das Wachstum von endometrialen Stromazellen über einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase nachgewiesen werden. Eine weitere *in vitro* Studie an Prostatakarzinomzellen zeigte nach ES-Gabe eine erhöhte Expression wichtiger Proteine mit inhibitorischer Wirkung auf den Zellzyklus, wie p21, p27, cyclin dependent kinase (CDK)-2 und Cyclin E, während die Proteinexpression von Cyclin D1 und B1 sowie CDK-1 verringert war [Naiki-Ito et al., 2015]. Die Regulation des Zellzyklus und damit die Hemmung der Zellproliferation stellt somit einen weiteren Wirkmechanismus von ES dar.

Darüber hinaus wird die Induktion der intrinsischen Apoptose von ES beeinflusst. Diese wird durch eine Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials verbunden mit einer Hemmung der B-cell lymphoma (Bcl)-2 Proteine induziert. Daraus resultiert eine Cytochrom-c-Freisetzung und eine nachfolgende Aktivierung von Caspase (Casp)-3, -8 und -9, welche die Apoptose vermitteln [Cory und Adams, 2002]. Es konnte sowohl in humanen Prostatakarzinomzelllinien als auch in humanen Adenokarzinomzellen des Kolons nachgewiesen werden, dass ES die Proteinexpression von Bax, Casp-3 und Cytochrom-c induziert, während die Bcl-2-Expression gehemmt wird [Naiki-Ito et al., 2015; Umesalma et al., 2015]. Weiterhin konnten bei der Behandlung humaner kolorektaler Karzinomzellen mit ES inhibitorische Effekte auf den PI3K/Proteinkinase B (AKT)-Signalweg in *in vitro* und *in vivo* Studien nachgewiesen werden. Die Inaktivierung des PI3K/AKT-Signalweges durch ES führt ebenfalls zu einer Unterdrückung der Bcl-2-Expression [Umesalma und Sudhandiran, 2011; Umesalma et al., 2015]. Somit wird der intrinsische Signalweg der Apoptose von ES über mehrere Mechanismen eingeleitet.

Ein weiterer Wirkmechanismus von ES ist die Hemmung des ERK-Signalweges. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass ES die Phosphorylierung von ERK inhibiert, was folglich die Proliferation hemmt [Masamune et al., 2005; Eskandari et al., 2016]. So konnte nach Gabe von ES die Proliferation von Prostatakarzinomzellen durch Hemmung des ERK-Signalweges inhibiert werden [Eskandari et al., 2016]. Jedoch zeigte eine andere *in vitro* Studie, dass ES die Expression von ERK in humanen Glioblastomzellen hochreguliert. Dies hatte zur Folge, dass ES zur Förderung der Apoptose in humanen Glioblastomzellen beitrug [González-Sarrías et al., 2010; Wang et al., 2016].

Weiterhin konnte für ES in mehreren Studien eine anti-angiogene Wirkung nachgewiesen werden. So konnte in verschiedenen *in vivo* Studien an unterschiedlichen Tumoren eine Hemmung der Expression von VEGF sowie VEGFR2 durch ES gezeigt werden [Kowshik et al., 2014; Ceci et al., 2016].

Aufgrund dieser anti-inflammatorischen, anti-proliferativen und anti-angiogenen Eigenschaften stellt ES eine vielversprechende Phytosubstanz zur Therapie der Endometriose dar.

3.3.2 I3C

I3C (3-(Hydroxymethyl)indol) (Abb. 4) entsteht durch den Abbau von Glucobrassicin (Indolyl-methyl Glucosinolat) durch Myrosinase. Glucobrassicin ist ein Derivat aus glucosinolathaltigen Lebensmitteln (Glucosinolaten), die zur Familie der Kreuzblütler (Brassicaceen) gehören. Wichtige Vertreter der Kreuzblütler sind Kohlgemüse, wie Weiß-, Rot-, Grün-, Rosen- und Blumenkohl, Wirsing, Brokkoli, Kohlrabi, Kohlrübe, Kresse, Senf, Radieschen, Meerrettich und Raps. Dabei enthalten alle genannten Gemüse jeweils unterschiedliche Konzentrationen an Indol-Glucosinolaten. Bei dem Verzehr von I3C wird dieses im sauren Magenmilieu zu verschiedenen Metaboliten umgewandelt. Hierzu zählen 3,3'-Diindolylmethan (DIM), Indolylcarbazol (ICZ), 2-(Indol-3-ylmethyl)-3,3'-diindolylmethan (LT), 5,6,11,12,17,18-Hexahydro-cyclononan-triindol (CT) und 1-(3-Hydroxymethyl)-indolyl-3-indolylmethan (HI-IM) [Grose und Bjeldanes, 1992; Schmandke, 2005].

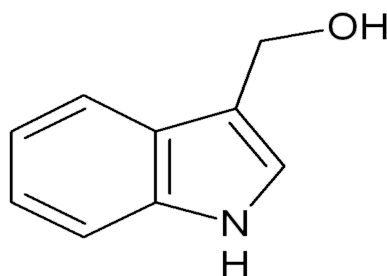


Abbildung 4: Strukturformel von I3C.

Vor allem DIM kommt hierbei eine große Bedeutung zu, da es als Hauptmetabolit bei der Verstoffwechslung von I3C als primär zirkulierende Verbindung im Plasma nachgewiesen werden kann. I3C lässt sich kurzzeitig im Plasma nachweisen, wird aber schnell absorbiert und metabolisiert [Anderton et al., 2004; Reed et al., 2006]. Um eine gute Bioverfügbarkeit von I3C zu erzielen, sollten daher höhere Dosierungen gewählt werden. Bislang wurden bereits Dosierungen zwischen 400-800 mg/Tag über 2 Monate an Menschen getestet, wobei sich eine gute Verträglichkeit zeigte [Reed et al., 2005].

Seit einigen Jahren werden sekundäre Pflanzenstoffe, wie I3C, auch als gesundheitsfördernde Nahrungsergänzungsmittel vermarktet [Ampofo et al., 2018]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass I3C bereits seit den 70er Jahren als chemopräventives Mittel angesehen wird [Wattenberg und Loub, 1978]. So belegen *in vitro* und *in vivo* Studien einen anti-kanzerogenen Effekt dieser Substanz in diversen Tumoren, wie z. B. Brust-, Zervix- und Endometriumkarzinomen, sowie ein verringertes Brustkrebsrisiko nach Einnahme von indolhaltigen Kohlgemüsesorten [Grubbs et al., 1995; Weng et al., 2008; Lu et al., 2012; Thomson et al., 2016]. Auch für die aus I3C entstandenen Metaboliten (DIM, CT, LT und ICZ) wurden anti-kanzerogene Wirkungen nachgewiesen [Schmandke, 2005].

Die intrazellulären Mechanismen, welche dabei von I3C beeinflusst werden, wurden in verschiedenen

in vitro und *in vivo* Studien identifiziert. So konnte eine pro-apoptotische Wirkung von I3C durch die Aktivierung des intrinsischen Signalweges nachgewiesen werden. Rahman et al. [2000] konnten zeigen, dass I3C die Bcl-2-Expression in Brustkrebszellen vermindert und eine Überexpression von Bax induziert. Das dadurch verschobene Verhältnis von Bax zu Bcl-2 begünstigt die Apoptose. Weiterhin konnte bei I3C-behandelten Leukämiezellen eine erhöhte Casp-8, -3 und -9 Aktivität nachgewiesen werden [Lu et al., 2012]. Dies zeigt, dass I3C auch den extrinsischen Signalweg der Apoptose induzieren kann.

Ein weiterer bedeutsamer Signalweg, der infolge des Einflusses von I3C ebenfalls zur Induktion von apoptotischen Prozessen führt, ist der PI3K/AKT-Signalweg. Hierbei wird PI3K über Wachstumsfaktoren aktiviert. Danach vermittelt PI3K eine Phosphorylierung und damit die Aktivierung von AKT, wodurch zum einen die Zellproliferation stimuliert und zum anderen die Apoptose gehemmt wird. So wird das Überleben der Zelle gesichert [Wymann und Pirola, 1998]. Auch Wachstumsfaktoren, wie der epidermal growth factor (EGF), induzieren eine Aktivierung von AKT. I3C hingegen hemmt die Expression der EGF-Rezeptoren sowie deren Autophosphorylierung, sodass auch die EGF-induzierte Phosphorylierung von PI3K ausbleibt. Weiterhin hemmt I3C die Phosphorylierung und die damit einhergehende Aktivierung der AKT-Kinase [Chinni und Sarkar, 2002]. Somit fördert I3C über die Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs ebenfalls die Apoptose.

Die Regulation des Zellzyklus und die damit verbundene Proliferation der Zellen ist ein weiterer Angriffspunkt von I3C. Neben der Induktion eines G₀/G₁-Arrestes senkte die Behandlung mit I3C die Proteinexpression von Cyclin A und Cyclin E und stimulierte die Proteinexpression von p53 sowie dem CDK-Inhibitor p21 in einem *in vitro* Leukämiezellmodell [Lu et al., 2012]. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass I3C die Expression von CDK-2 und CDK-6 in Brustkrebszellen inhibiert, wodurch ebenfalls ein G₁-Arrest induziert wird [Cover et al., 1998]. Ein weiterer Signalweg, über den I3C anti-proliferative Effekte ausübt, ist die ERK1/2-Signalkaskade. ERK1/2 zählt zu den MAP-Kinasen und trägt über die Aktivierung von Wachstumsfaktoren zur Proliferation bei [Cargnello und Roux, 2011]. Dazu konnten Kunimasa et al. [2010] zeigen, dass I3C und sein Metabolit DIM die Phosphorylierung von ERK1/2 hemmen.

Durch I3C ausgelöste anti-angiogene Effekte werden in der Literatur ebenfalls beschrieben. Für die Angiogenese ist vor allem dessen Stimulation durch wachstumsfördernde Faktoren notwendig, die eine Endothelzellproliferation und -migration bewirken. Studien berichten von einem inhibitorischen Einfluss von I3C auf die VEGF-Sekretion und eine daraus resultierende Inaktivierung von AKT, wodurch die Zellproliferation gehemmt werden konnte [Wu et al., 2005]. Des Weiteren sind Matrixmetalloproteinasen (MMP) bei der Angiogenese von großer Relevanz, da diese verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix spalten [McCawley und Matrisian, 2001]. In einer *in vitro* Studie an Endo-

thelzellen konnte nachgewiesen werden, dass I3C die endotheliale VEGF-Sekretion und die Aktivität von MMP-2 und -9 verringert. Infolgedessen konnte das Zellwachstum der Endothelzellen inhibiert werden [Wu et al., 2005].

Als anti-inflammatorisch wirkende Substanz inhibiert I3C auch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-10 [Tsai et al., 2010]. Die Expression dieser Zytokine wird vor allem durch den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor $\text{NF-}\kappa\text{B}$ reguliert [Nennig und Schank, 2017]. Takada et al. [2005] konnten zeigen, dass I3C die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Transkriptionsaktivität sowie die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Kinase inhibiert. Folglich konnte eine verminderte Expression von COX-2, MMP-9 und Bcl-2 gefunden werden, wodurch wiederum die Apoptose begünstigt wurde. In einem *in vivo* Ischämiemodell zur Analyse inflammatorischer Prozesse an Endothelzellen während einer Hypoxie konnte durch die Gabe von I3C die Translokation der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Untereinheit p65 in den Zellkern gehemmt werden. Infolgedessen wurde der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg durch I3C inhibiert, was zu einer reduzierten Bindung von Leukozyten an Endothelzellen führte. Dadurch migrierten weniger Leukozyten in das post-ischämische Gewebe und die Inflammation wurde gehemmt [Ampofo et al., 2017]. Die Hemmung von Inflammation und Entzündungsmediatoren stellt somit eine weitere Eigenschaft von I3C dar. Im Bezug dazu ist eine Entzündung auch häufig mit der Bildung von ROS verbunden [Ampofo et al., 2017]. Als Antioxidans hat I3C die Fähigkeit, reaktive Radikale abzufangen [Shertzer et al., 1988]. So konnte nachgewiesen werden, dass I3C einen intrazellulären Anstieg von ROS inhibiert [Ping et al., 2011]. Im Gegensatz dazu wurde auch gezeigt, dass I3C die Erzeugung von ROS und die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (OH-Radikalen) fördert und somit zur Apoptose beiträgt [Hwang et al., 2011; Bai et al., 2013].

Im Hinblick auf die Endometriose ist vor allem die Wirkung von I3C auf den Östradiol-Metabolismus von großer Bedeutung. Die Verstoffwechselung von Östradiol zu 2-Hydroxyöstron mit Hilfe der Östradiol-2-Hydroxylase ist Cytochrom-P450-abhängig. I3C ist ein starker Induktor der Cytochrom-P450-Enzyme und stimuliert ebenfalls die Östradiol-2-Hydroxylase [Verhoeven et al., 1997]. Infolgedessen bewirkt I3C einen Anstieg des 2-Hydroxyöstron-Spiegels, welcher im Gegensatz zu Östradiol nur eine minimale östrogene Aktivität aufweist [Enríquez et al., 2016]. Eine geringere Aktivität von Östradiol hat somit auch einen geringeren Einfluss auf die Proliferation von Endometrioseherden [Kitawaki et al., 2002]. In Bezug dazu konnte in einer *in vitro* Studie belegt werden, dass I3C auch die hormonaktivierte Transkriptionsaktivität von $\text{ER-}\alpha$ unterdrückt [Meng et al., 2000]. Erhöhte $\text{ER-}\alpha$ -Spiegel finden sich oftmals in der Peritonealflüssigkeit von Endometriose-Patientinnen und korrelieren mit den gesteigerten pro-inflammatorischen Zytokinspiegeln [Montagna et al., 2008]. Dementsprechend nimmt I3C über verschiedene Mechanismen Einfluss auf den Östradiol-Metabolismus und folglich auch auf die Endometriose.

Die zuvor beschriebenen anti-angiogenen, anti-proliferativen, anti-inflammatorischen und pro-apop-

totischen Eigenschaften von I3C lassen erwarten, dass I3C in Bezug auf die Endometriose eine therapeutische Wirkung haben könnte. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, dies genauer in einem Mausmodell der Erkrankung zu untersuchen.

4 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Studienabschnitt die Wirkung von ES auf Endometrioseherde im Mausmodell analysiert. Hierbei wurden die folgenden Hypothesen geprüft:

1. ES inhibiert das Größenwachstum von induzierten Endometrioseherden.
2. Die Proliferation der Stroma- und Drüsenzellen in den Endometrioseherden wird von ES gehemmt.
3. ES inhibiert die Vaskularisierung der Endometrioseherde durch seine anti-angiogene Wirkung.
4. ES hemmt die Expression von proliferativen, pro-angiogenen und pro-inflammatorischen Proteinen in den Endometrioseherden.
5. ES inhibiert die Expression der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β in den Endometrioseherden.

In einem zweiten Studienabschnitt wurde die Wirkung von I3C auf Endometrioseherde im Mausmodell analysiert. Hierbei wurden die folgenden Hypothesen geprüft:

1. I3C inhibiert das Größenwachstum von induzierten Endometrioseherden.
2. Die Proliferation der Stroma- und Drüsenzellen in den Endometrioseherden wird von I3C gehemmt.
3. I3C inhibiert die Vaskularisierung der Endometrioseherde durch seine anti-angiogene Wirkung.
4. Die anti-angiogene Wirkung von I3C kann auf eine reduzierte Endothelzellproliferation zurückgeführt werden.
5. I3C hemmt die Expression von proliferativen, pro-angiogenen und pro-inflammatorischen Proteinen in den Endometrioseherden.
6. I3C inhibiert die Expression der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β in den Endometrioseherden.

5 Material und Methoden

5.1 Ethikerklärung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierexperimente wurden von der örtlichen staatlichen Behörde (Landesamt für Verbraucherschutz, Saarbrücken, Deutschland; Genehmigungsnummer: 47/2016; 11/2017) genehmigt und entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz und dem Leitfaden der National Institutes of Health für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington DC, USA) durchgeführt.

5.2 Versuchstiere

Als Spendertiere zur Erzeugung von uterinen Gewebeproben und als Empfängertiere zur Induktion von Endometrioseherden in der Bauchhöhle wurden weibliche BALB/c-Mäuse (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland) eingesetzt. Die Mäuse waren 12-20 Wochen alt und ihr Körpergewicht betrug 18-21 g. Der Allgemeinzustand der Tiere sowie das Körpergewicht wurden über den Zeitraum der Versuche kontinuierlich überwacht. Die Mäuse wurden in Gruppen von 3-6 Tieren unter klimatisierten Bedingungen mit einem 12 h/12 h-Tag/Nachtrhythmus gehalten. Die bereitgestellte Nahrung in Form von Standardpelletfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und das Trinkwasser waren jederzeit frei verfügbar.

5.3 Modell der intraperitonealen Endometriose

5.3.1 Bestimmung des Zyklusstadiums

Für die Versuche wurden nur Mäuse verwendet, die sich im Stadium des Östrus befanden, um hormonelle Schwankungen zwischen einzelnen Versuchstieren zu minimieren. Die Bestimmung des Zyklusstadiums erfolgte anhand einer Vaginallavage. Hierzu wurden 15 µL 0,9%-ige Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in die Vagina der jeweiligen Mäuse pipettiert. Diese wurden mit den sich in der Vagina befindlichen Zellen vermischt und anschließend auf einen Objektträger aufgetragen. Das Zyklusstadium wurde mit Hilfe eines Phasen-Kontrast-Mikroskops (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

Der Sexualzyklus einer Maus ist polyzyklisch und lässt sich in die vier Stadien Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus einteilen [Byers et al., 2012]. Diese Stadien wiederholen sich alle 4-5 Tage, falls sie nicht durch eine Schwangerschaft unterbrochen werden. In jedem dieser Stadien ist eine bestimmte Zellart charakteristisch, welche die mikroskopische Zuteilung zu einem dieser Stadien

ermöglicht. Während des Proöstrus findet man überwiegend kernhaltige Intermediärzellen und in der frühen Phase auch Parabasalzellen (Abb. 5A). Beim Übergang zum Östrus lassen sich vermehrt Superfizialzellen nachweisen. Im Östrus selbst sind fast ausschließlich die charakteristischen kernlosen verhornten Epithelzellen zu finden (Abb. 5B). Der Metöstrus präsentiert sich als ein Mischbild aus teils Intermediärzellen, den keratinisierten Epithelzellen und zusätzlichen Leukozyten (Abb. 5C). Die Phase des Diöstrus ist durch einen fast 100%-igen Anteil an Leukozyten gekennzeichnet (Abb. 5D). Am Ende des Diöstrus findet man auch vereinzelte Intermediärzellen. Auf Grund des fließenden Übergangs von einem Stadium zum nächsten lassen sich die unterschiedlichen Stadien nicht immer eindeutig zuweisen. Dennoch ermöglicht die Quantifizierung der Zelltypen eine vereinfachte Zuordnung zu den einzelnen Stadien.

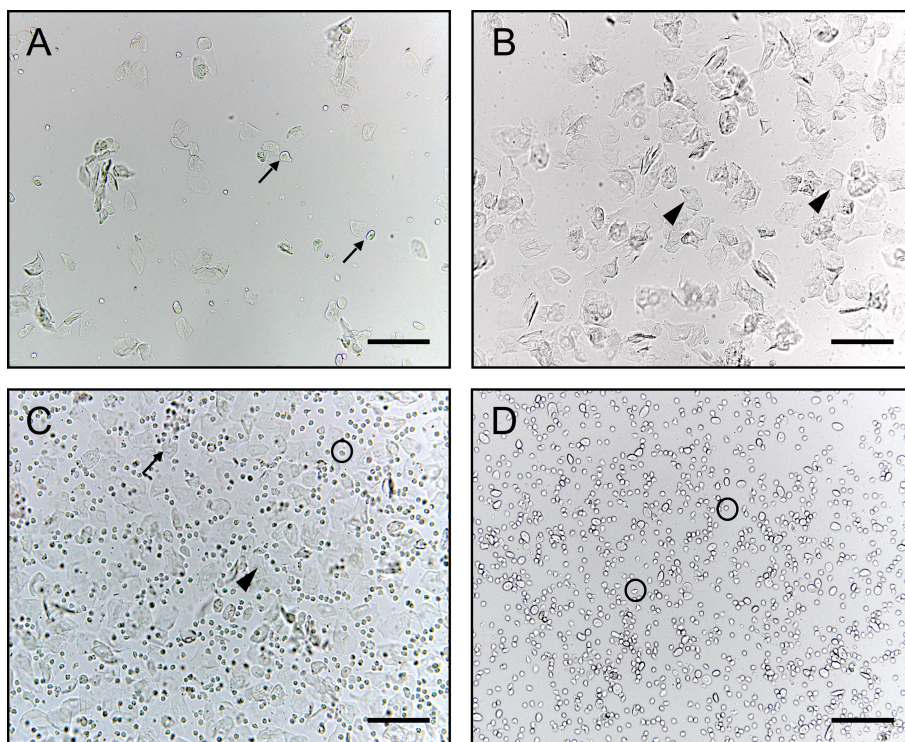


Abbildung 5: Phasen-Kontrast-mikroskopische Aufnahmen der Vaginalzytologie einer weiblichen BALB/c-Maus. **A:** Proöstrus mit Intermediärzellen (Pfeile). **B:** Östrus mit keratinisierten Epithelzellen (Pfeilspitzen). **C:** Metöstrus mit Intermediärzellen (Pfeil), keratinisierten Epithelzellen (Pfeilspitze) und Leukozyten (Kreis). **D:** Diöstrus mit fast ausschließlichem Vorkommen von Leukozyten (Kreise). Maßstab: 100 µm.

5.3.2 Entnahme der uterinen Gewebeproben

Zur Induktion von Endometrioseherden in der Bauchhöhle von Mäusen wurden Gewebeproben aus dem Uterus von Spendertieren auf das Peritoneum von Empfängertieren transplantiert. Für die Entnahme und Transplantation der Gewebeproben wurden die Tiere mittels einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin®; Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun®; Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Nach Desinfektion der Bauchdecke mit 70% Alkohol erfolgte eine mediane Längslaparotomie mit nachfolgender

extraabdomineller Verlagerung des Darms. Anschließend konnten die Uterushörner nach Abtrennung der kranial liegenden Tuben und der kaudalen Cervix uteri entnommen und in einer Petrischale mit 37 °C warmen Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin; PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) platziert werden (Abb. 6A). Die beiden Uterushörner wurden dann unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) der Länge nach mit Hilfe einer Mikroschere aufgeschnitten. Danach wurden die Uterushörner mittels Einmalkanülen (BD Microlance TM 3; Becton Dickinson & Company Limited, Drogheda, Irland) auf einer Korkunterlage fixiert. Nun konnten mit einer Biopsiestanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) 2 mm große Gewebeproben gewonnen werden (Abb. 6B). Diese wurden in einer separaten mit DMEM gefüllten Petrischale bei 37 °C aufbewahrt. Nach der Uterusentnahme wurden die Spendertiere durch Ausbluten nach Durchtrennung der Vena cava inferior getötet.

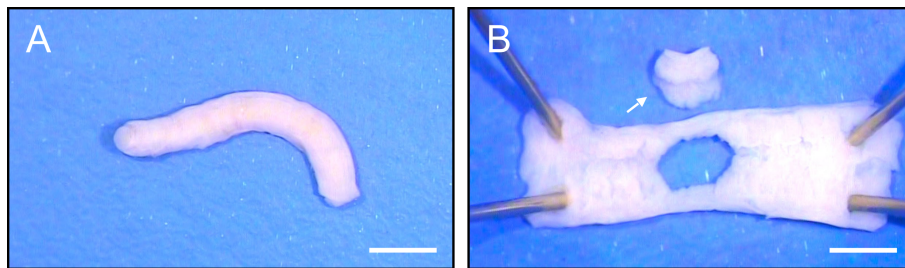


Abbildung 6: Stereomikroskopische Aufnahmen von der Entnahme uteriner Gewebeproben. **A:** Exzidiertes Uterushorn in DMEM. **B:** Längs eröffnetes Uterushorn mit einer 2 mm großen ausgestanzten Gewebeprobe (Pfeil). Maßstab: A = 3,5 mm; B = 2 mm.

5.3.3 Transplantation der uterinen Gewebeproben

Für die syngene Transplantation der uterinen Gewebeproben wurden die Empfängertiere mit Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin®; Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun®; Bayer AG) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Das Fell der Bauchdecke wurde mit Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp., Mississauga, ON, Kanada) entfernt und die Bauchdecke anschließend mit 70% Alkohol desinfiziert. Nach erfolgter medianer Längslaparotomie konnten die uterinen Gewebeproben mit Hilfe eines 6-0 Prolene-Fadens (Ethicon Produkte, Norderstedt, Deutschland) am Peritoneum fixiert werden (Abb. 7A). Hierbei wurde beachtet, dass das Endometrium der Gewebeproben auf dem Peritoneum lag, während das Perimetrium zur freien Bauchhöhle zeigte. Auf jeder Seite des Bauchraumes wurden so zwei Proben festgenäht (Abb. 7B). Anschließend wurde das eröffnete Abdomen mit einer fortlaufenden 6-0 Prolene-Naht (Ethicon Produkte) und die darüberliegende Haut mit einer fortlaufenden 5-0 Prolene-Naht (Ethicon Produkte) verschlossen. Als intra- und postoperative Schmerzmedikation erhielten die Tiere eine subkutane Carprofen-Injektion (10 mg/kg; Rimadyl®; Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland).

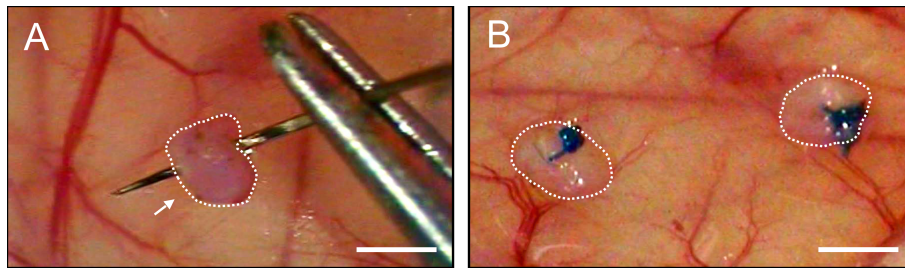


Abbildung 7: Transplantation von uterinen Gewebeproben auf das Peritoneum. **A:** Fixierung einer Gewebeprobe am Peritoneum einer BALB/c-Empfängermaus zur Induktion eines peritonealen Endometrioseherdes (Pfeil: Nadel mit Transplantat (gepunktete Linie)). **B:** Typisches Erscheinungsbild der Transplantate (gepunktete Linien) direkt nach der Fixierung. Maßstab: 2 mm.

5.4 Messung des Volumens der Endometrioseherde mittels hochauflösendem Ultraschall

Um das Wachstum der sich entwickelnden Endometrioseherde kontinuierlich zu überwachen, wurde eine nichtinvasive, hochauflösende Ultraschallbildgebung (Vevo770, VisualSonics, Toronto, Kanada) durchgeführt. Diese sonographischen Untersuchungen fanden bei allen Tieren an Tag 0 (Tag der Transplantation), 7, 14, 21 und 28 statt. Für die Messungen wurden die Mäuse mittels 5 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH; Unterschleißheim, Deutschland) in 100% Sauerstoff narkotisiert und in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch fixiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mit 2 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH) über eine Atemmaske. Mit Hilfe einer Enthaarungscreme (Nair hair removal lotion; Church & Dwight Canada Corp.) wurde die Bauchdecke der Tiere vom Fell befreit und anschließend das Ultraschallgel (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) aufgebracht (Abb. 8A).

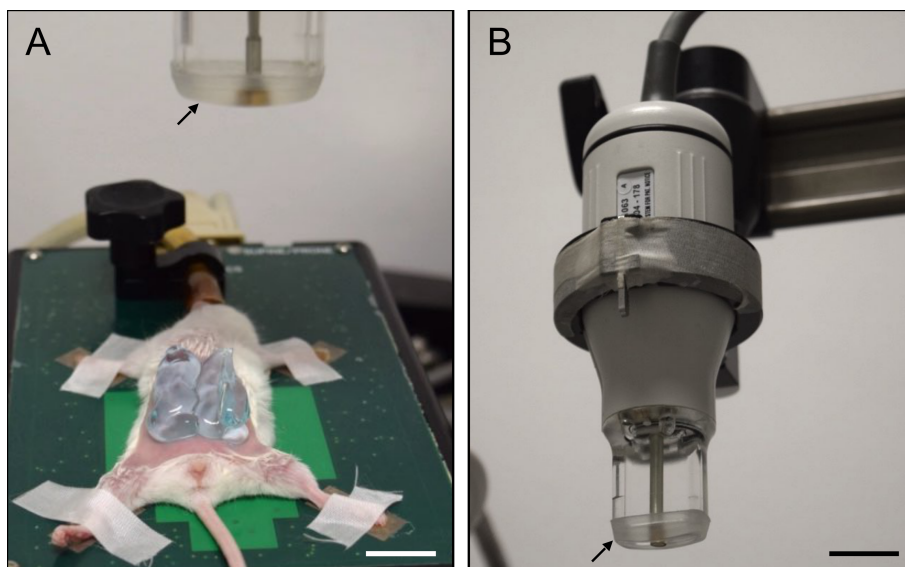


Abbildung 8: Darstellung einer Ultraschalluntersuchung. **A:** Abdominale Ultraschalluntersuchung der Maus mit sichtbarem Teil des 40 MHz Ultraschallkopfes (Pfeil). **B:** 40 MHz Ultraschallkopf (Pfeil). Maßstab: A = 1,5 cm; B = 2,5 cm.

Jeder einzelne Endometrioseherd wurde nun sonographisch mit einem 704RMV (VisualSonics)-Schallkopf mit einer Frequenz von 40 MHz und einer Fokustiefe von 6 mm aufgesucht (Abb. 8B). Anschließend wurden automatisiert zweidimensionale Schnittbilder in einem Abstand von 50 µm innerhalb einer Bildsequenz aufgenommen. Aus diesen Bildern wurde mit Hilfe einer speziellen Software (Vevo 770 V2.3.0, VisualSonics) eine dreidimensionale Rekonstruktion der Endometrioseherde erstellt. Darauf basierend wurden nun planimetrisch die Herd- und Zystengrenzen gemessen und daraus das Stroma- und Zystenvolumen sowie das Herdvolumen in mm³ errechnet. Aufgrund dieser Daten konnte zusätzlich das Herdwachstum, das Stromawachstum sowie der Anteil der zystenenthaltenden Herde in % ermittelt werden.

5.5 Messung der Größe der Endometrioseherde mittels digitalem Messschieber

Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 28 Tagen wurden die Tiere nach der letzten Ultraschalluntersuchung durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin®; Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun®; Bayer AG) narkotisiert. Anschließend wurde die Bauchdecke entlang der ursprünglichen Naht eröffnet und die auf dem Peritoneum induzierten Endometrioseherde wurden aufgesucht (Abb. 9A). Alle vier Endometrioseherde wurden unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH) mit einem digitalen Messschieber (0-150 mm; Technologiezentrum W-tec, Wuppertal, Deutschland) vermessen (Abb. 9B). Hierbei wurde jeweils der größte Längs- und der dazu rechtwinklige Querdurchmesser bestimmt. Anhand der Formel $d_1 \times d_2 \times \pi / 4$ konnte so die Größe der Endometrioseherde errechnet werden [Becker et al., 2006]. Nach der Messung wurden die Endometrioseherde sowie die Ovarien und Uteri entnommen und für weitere Untersuchungen asserviert. Am Ende wurden die Tiere durch Inzision der Vena cava inferior getötet.

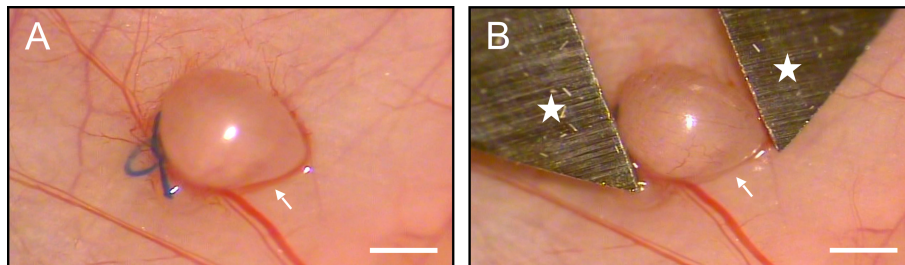


Abbildung 9: Aufnahmen induzierter Endometrioseherde in der Bauchhöhle. **A:** Typisches Erscheinungsbild eines Endometrioseherdes (Pfeil). **B:** Zweidimensionale Vermessung des Endometrioseherdes (Pfeil) mittels digitalem Messschieber (Sterne). Maßstab: 1,25 mm.

5.6 Histologie und Immunhistochemie

5.6.1 HE-Färbung

Die entnommenen Endometrioseherde, Ovarien und Uteri wurden für 24 Stunden in 4%-Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms (Cut 5062; SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland) wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Jeder 10. Gewebeschnitt wurde nach einem Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, um die Morphologie der Gewebeproben zu analysieren. Bei dieser Färbung stellen sich basische Zellorganellen durch Eosin rot dar und saure Zellbestandteile, wie z. B. der Zellkern, präsentieren sich aufgrund des Hämatoxylins bläulich.

5.6.2 CD31-Färbung

Die cluster of differentiation (CD)31-Färbung ermöglichte die Analyse der Gefäßdichte. Aufgrund seiner Funktion als Transmembranglykoprotein vermittelt CD31 die Zelladhäsion und wird überwiegend auf Endothelzellen exprimiert [Newman, 1997; Cao et al., 2002]. Zur Färbung wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:100; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und als Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Ratte-Alexa-Indocarbocyanin-Antikörper (1:200; Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) dargestellt. Zur quantitativen Analyse der gefärbten Schnitte diente ein BZ-8000 Mikroskop (Keyence, Osaka, Japan). Mit Hilfe der Biozero Analyse-Software (Version 3.60; Keyence) ließ sich die Fläche eines Endometrioseherdes planimetrisch ermitteln. Anschließend wurde die Anzahl der Gefäße im Endometrioseherd gezählt und in Relation zu dessen Fläche als Mikrogefäßdichte (in mm^{-2}) angegeben.

5.6.3 Ki67-Färbung

Die Ki67-Färbung diente zur Darstellung proliferierender Zellen. Während der aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 - und M-Phase) wird Ki67 vermehrt exprimiert. Wenn sich die Zelle jedoch in der Ruhephase (G_0) befindet, ist kein Ki67 nachweisbar [Scholzen und Gerdes, 2000]. Somit konnte mit dem Nachweis von Ki67 die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen in den Endometrioseherden bestimmt werden. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-Ki67-Antikörper (1:500; Abcam, Cambridge; Vereinigtes Königreich) und als Sekundärantikörper ein biotinylierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (ready to use; Abcam) verwendet. Zur Visualisierung der Bindung der Antikörper an Antigene wurde Avidin-Peroxidase (POD) (ready-to-use, Abcam) hinzugegeben, während Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen diente. Dadurch konnten die Ki67-positiven Zellkerne rötlich-braun dargestellt werden, während die negativen Zellkerne mit Hämalan

bläulich angefärbt wurden. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Mikroskopes (BX-60; Olympus), wobei in 4 randomisierten Bildern pro Gewebeschnitt jeweils die Proliferationsrate der Stroma- und Drüsenzellen in % bestimmt wurde.

5.6.4 Ki67/CD31-Doppelfärbung

Bei der Ki67/CD31-Doppelfärbung handelt es sich um eine Immunfluoreszenzfärbung, mit der speziell die Proliferation CD31-positiver Endothelzellen untersucht werden konnte. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) gefärbt und stellten sich blau dar. Für die CD31-Färbung wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper (1:100; Dianova GmbH) und als Sekundärantikörper ein Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:200; Alexa555; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) verwendet. Für die Ki67-Färbung wurde als Primärantikörper ein polyklonaler Kaninchen-anti-Human-Ki67-Antikörper (1:200; Abcam) und als Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Ratte-Antikörper (1:200; Alexa555; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd) verwendet. Somit präsentierten sich die proliferierenden Endothelzellen unter Fluoreszenzlicht in Rot, wohingegen die CD31-gefärbten Endothelzellen in Grün zu erkennen waren. Zur Analyse wurden pro Schnitt jeweils ca. 100 Endothelzellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (BX-60; Olympus) randomisiert ausgewählt. Davon wurden die Ki67-positiven und Ki67-negativen Endothelzellen bestimmt und die Proliferationsrate in % aller analysierten CD31-positiven Zellen berechnet.

5.7 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, der die Expression eines bestimmten Proteins in einem Gewebe nachweist [Burnette, 1981]. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Expression von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, AKT, phosphorylated protein kinase B (pAKT), COX-2, PI3K, NF- κ B, ER- α und ER- β . Zur Proteinextraktion wurden die entnommenen Endometrioseherde in Lysepuffer (10 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,5% Triton X 100; 0,02% NaN₃ (Roth)) mit Zusatz von Protease-Inhibitor-Cocktail und Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2 (je 1:100 v/v; Sigma-Aldrich) inkubiert und mit 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 30 Sekunden mechanisch homogenisiert (Miccra, D-1; Miccra GmbH, Heitersheim, Deutschland). Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden die Proben zügig auf Eis aufgetaut und für 30 Minuten bei 16000xg (4 °C) zentrifugiert (Fresco 21, Heraeus; Thermo scientific, Schwerte, Deutschland). Die Überstände wurden als Ganzzelllysate entnommen. Anschließend erfolgte mit Hilfe eines Photometers (GeneQuant; Amersham pharmacia biotech, Freiburg, Deutschland) die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry [Lowry et al., 1951]. Danach wurden die Proteinextrakte mittels 2x Sample Buffer nach Laemm-

li (4% SDS; 20% Glycerin; 10% β -Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau; 0,125 M TRIS-HCl pH 6,8; Sigma-Aldrich) in einem 5-minütigen kochenden Wasserbad denaturiert. Direkt im Anschluss wurden jeweils 30 μ g Protein pro Tasche auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und durch Gelelektrophorese anhand des Molekulargewichts getrennt. Die getrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren (Trans Blot Turbo Transfer System, BioRad, München, Deutschland) auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (BioRad) transferiert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membranen mit entfetteter Trockenmilch (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) blockiert. Zur Detektion der Targetproteine wurden die Membranen jeweils für 4 Stunden bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4 °C mit den in Tab. 2 aufgeführten Primärantikörpern inkubiert (Tab. 2).

Tabelle 2: Übersicht der Targetproteine und ihrer dazugehörigen Primärantikörper für die Western Blot-Analyse.

Targetprotein	Primärantikörper
VEGF	Polyklonaler Kaninchen-anti-VEGF-Antikörper (1:50 Abcam)
VEGFR2	Monoklonaler Kaninchen-anti-VEGFR2-Antikörper (1:100; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland)
ERK	Polyklonaler Kaninchen-anti-ERK-Antikörper (1:300; Abcam)
pERK	Monoklonaler Maus-anti-pERK-Antikörper (1:300; Abcam)
AKT	Monoklonaler Kaninchen-anti-AKT-Antikörper (1:300; Cell Signaling Technology)
pAKT	Monoklonaler Kaninchen-anti-pAKT1/2/3-Antikörper (1:100; Cell Signaling Technology)
COX-2	Polyklonaler Kaninchen-anti-COX-2-Antikörper (1:300; Abcam)
PI3K	Monoklonaler Maus-anti-PI3K-Antikörper (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
NF- κ B	Monoklonaler Maus-anti-NF- κ B-Antikörper (1:50; R&D Systems)
ER- α	Monoklonaler Kaninchen-anti-ER- α -Antikörper (1:50; Cell Signaling Technology)
ER- β	Polyklonaler Kaninchen-anti-ER- β -Antikörper (1:50; Abcam)
β -Aktin	Monoklonaler Maus-anti- β -Aktin-Antikörper (1:5000; Sigma-Aldrich)

Danach erfolgte für 90 Minuten eine Inkubation bei Raumtemperatur mit einem anti-Maus-IgG-Antikörper (1:1500; Dako/Agilent, Hamburg, Deutschland) oder anti-Kaninchen-IgG-Antikörper kon-

jugiert mit Meerrettichperoxidase (1:1000; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) als Sekundärantikörper. Zur Visualisierung der Protein-Antikörper-Komplexe wurde ein ECL-Substrat (BioRad) zugesetzt und die Membranen mittels eines ChemoCam-Imagers (Intas; Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Die Intensität der einzelnen Banden wurde mit der Software Lab Image 1D (Intas, Science Imaging Instruments) gemessen. Zur Kontrolle wurde als Referenzprotein β -Aktin verwendet.

5.8 Experimentelles Protokoll

5.8.1 ES

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Studienabschnitt die Wirkung von ES auf das Größenwachstum und die Vaskularisierung von Endometrioseherden analysiert. Hierzu wurden sowohl zur Entnahme der uterinen Gewebeproben als auch zur Induktion der Endometrioseherde Tiere verwendet, die sich im Zyklusstadium des Östrus befanden (siehe Abschnitt 5.3.1).

In einem ersten Experiment wurden aus 4 Spendertieren 80 uterine Gewebeproben isoliert und jeweils 4 Gewebeproben in die Bauchhöhle von 20 Empfängertieren transplantiert. Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je 10 Tieren aufgeteilt und intragastral mit 50 mg/kg ES (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 ml Maisöl (Sigma-Aldrich) oder 0,1 ml Maisöl als Vehikel (Kontrolle) täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen behandelt. Am Tag der Transplantation (d0) sowie an den Tagen 7, 14, 21 und 28 wurden die Herde sonographisch untersucht (siehe Abschnitt 5.4). Nach der Ultraschalluntersuchung an Tag 28 wurde das Abdomen der Mäuse eröffnet und die Endometrioseherde mit einem digitalen Messschieber vermessen (siehe Abschnitt 5.5). Aus den Daten der Ultraschalluntersuchung sowie des digitalen Messschiebers konnten folgende Parameter bestimmt werden:

- Größe der Endometrioseherde [mm^2] (siehe Abschnitt 5.5)
- Gesamtvolumen der Herde [mm^3] (siehe Abschnitt 5.4)
- Stromavolumen [mm^3] (siehe Abschnitt 5.4)
- Zystenvolumen [mm^3] (siehe Abschnitt 5.4)
- Wachstumsrate der Endometrioseherde [%] (siehe Abschnitt 5.4)
= $\frac{\text{Gesamtvolumen Tag X} - \text{Gesamtvolumen Tag 0}}{\text{Gesamtvolumen Tag 0}} \times 100$
- Wachstumsrate des Stromagewebes [%] (siehe Abschnitt 5.4)
= $\frac{\text{Stromavolumen Tag X} - \text{Stromavolumen Tag 0}}{\text{Stromavolumen Tag 0}} \times 100$

- Prozentualer Anteil der Zysten pro Tier [%] (siehe Abschnitt 5.4)
= Anzahl der zystenenthaltenden Herde / Gesamtzahl der Herde $\times 100$

Anschließend wurden die Tiere getötet und die Endometrioseherde sowie die Uteri und Ovarien entnommen und für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen asserviert (siehe Abschnitt 5.6). Diese umfassten HE-Färbungen zur morphologischen Analyse (siehe Abschnitt 5.6.1), CD31-Färbungen zur Detektion von Mikrogefäßen (siehe Abschnitt 5.6.2) und Ki67-Färbungen zur Detektion proliferierender Zellen (siehe Abschnitt 5.6.3). Bei diesen Untersuchungen wurden folgende Parameter erhoben:

- Mikrogefäßdichte [mm^{-2}] (siehe Abschnitt 5.6.2)
= Anzahl der CD31-positiven Mikrogefäße im Endometrioseherd / Fläche des Endometrioseherdes
- Proliferationsrate der Zellen pro Tier [%] (siehe Abschnitt 5.6.3)
= Anzahl der Ki67-positiven Zellen / Gesamtzahl der Zellen $\times 100$

In einem zweiten Experiment wurde die Wirkung von ES auf die frühe Phase der Entwicklung von Endometrioseherden über 7 Tage untersucht. Dazu wurden aus 3 Spendertieren 48 uterine Gewebeprobe isoliert und jeweils 4 Gewebeprobe in die Bauchhöhle von 12 Empfängertieren transplantiert. Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je 6 Tieren aufgeteilt und intragastral mit 50 mg/kg ES (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 ml Maisöl (Sigma-Aldrich) oder 0,1 ml Maisöl als Vehikel (Kontrolle) täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen behandelt. An Tag 7 wurden die Tiere durch Inzision der Vena cava inferior getötet und die Endometrioseherde entnommen, um für weitere Untersuchungen asserviert zu werden (siehe Abschnitt 5.6). Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen mitsamt der Datenauswertung wurden im zweiten Experiment genauso durchgeführt, wie bereits oben beschrieben.

In einem dritten Experiment wurde die Wirkung von ES auf die Expression von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, AKT, pAKT, COX-2, PI3K, NF- κ B, ER- α und ER- β mit Hilfe von Western Blotting 7 Tage nach Induktion der Endometrioseherde untersucht. Dazu wurden aus 2 Spendertieren 36 uterine Gewebeprobe isoliert und jeweils 6 Gewebeprobe in die Bauchhöhle von 6 Empfängertieren transplantiert. Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je 3 Tieren aufgeteilt und intragastral mit 50 mg/kg ES (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 ml Maisöl (Sigma-Aldrich) oder 0,1 ml Maisöl als Vehikel (Kontrolle) täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen behandelt.

An Tag 7 wurden die Tiere durch Inzision der Vena cava inferior getötet, die Endometrioseherde exzidiert und in Lysepuffer asserviert. Anschließend erfolgte die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot (siehe Abschnitt 5.7).

5.8.2 I3C

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von I3C auf das Wachstum und die Vaskularisierung von Endometrioseherden untersucht. Sowohl zur Entnahme der uterinen Gewebeproben als auch zur Induktion der Endometrioseherde wurden Tiere verwendet, die sich im Zyklusstadium des Östrus befanden (siehe Abschnitt 5.3.1).

In einem ersten Experiment wurden aus 4 Spendertieren 64 uterine Gewebeproben isoliert und jeweils 4 Gewebeproben in die Bauchhöhle von 16 Empfängertieren transplantiert. Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je 8 Tieren aufgeteilt und intragastral mit 120 mg/kg I3C (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 ml Maisöl (Sigma-Aldrich) oder 0,1 ml Maisöl als Vehikel (Kontrolle) täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen behandelt. Die sonographische Untersuchung, die Vermessung mittels digitalem Messschieber sowie die Berechnung aller Parameter in den Endometrioseherden wurden analog zu den Experimenten für ES durchgeführt (siehe Abschnitt 5.8.1). Die weiteren histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen der entnommenen Endometrioseherde, Uteri und Ovarien umfassten ebenfalls HE-, CD31- und Ki67-Färbungen (siehe Abschnitt 5.8.1). Zusätzlich wurde eine Ki67/CD31-Doppelfärbung zur Quantifizierung proliferierender Endothelzellen durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6.4). Damit konnte der folgende zusätzliche Parameter bestimmt werden:

- Proliferationsrate der Endothelzellen pro Endometrioseherd [%] (siehe Abschnitt 5.6.4)
= Anzahl der Ki67-positiven Endothelzellen / Gesamtzahl der Endothelzellen $\times$ 100

In einem zweiten Experiment wurde die Wirkung von I3C auf die frühe Phase der Entwicklung von Endometrioseherden über 7 Tage untersucht. Dazu wurden aus 3 Spendertieren 48 uterine Gewebeproben isoliert und jeweils 4 Gewebeproben in die Bauchhöhle von 12 Empfängertieren transplantiert. Die Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je 6 Tieren aufgeteilt und intragastral mit 120 mg/kg I3C (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 ml Maisöl (Sigma-Aldrich) oder 0,1 ml Maisöl als Vehikel-Kontrolle täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen behandelt. An Tag 7 wurden die Tiere durch Inzision der Vena cava inferior getötet und die Endometrioseherde sowie die Uteri und Ovarien entnommen und für histologische und immunhistochemische Untersuchungen asserviert (siehe Abschnitt 5.6). Diese umfassten HE-, CD31- und Ki67-Färbungen und wurden ebenso wie in Abschnitt 5.8.1 durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung proliferierender Endothelzellen mittels Ki67/CD31-Doppelfärbung (siehe Abschnitt 5.6.4).

In einem dritten Experiment wurde die Wirkung von I3C auf die Expression von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, AKT, pAKT, COX-2, PI3K, NF- κ B, ER- α und ER- β mit Hilfe von Western Blotting innerhalb der ersten 7 Tage untersucht. Dazu wurden aus 2 Spendertieren 36 uterine Gewebeproben isoliert und jeweils 6 Gewebeproben in die Bauchhöhle von 6 Empfängertieren transplantiert. Die

Mäuse wurden randomisiert in zwei Gruppen mit je 3 Tieren aufgeteilt und täglich intragastral mit 120 mg/kg I3C (Sigma-Aldrich) gelöst in 0,1 ml Maisöl (Sigma-Aldrich) oder 0,1 ml Maisöl als Vehikel (Kontrolle) über einen Zeitraum von 7 Tagen behandelt.

An Tag 7 wurden die Tiere durch Inzision der Vena cava inferior getötet, die Endometrioseherde exzidiert und in Lysepuffer asserviert. Anschließend erfolgte die Western Blot-Analyse (siehe Abschnitt 5.7).

5.9 Statistik

Die deskriptive Statistik der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2019 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Dabei wurde der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) bestimmt. Für die graphische Darstellung wurde SigmaPlot 2013 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der SigmaStat Statistical Software (Version 13; Jandel Scientific).

Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden bei Normalverteilung der Werte mittels t-Test für unabhängige Stichproben geprüft. Nicht normalverteilte Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test geprüft. Unterschiede über den Zeitverlauf innerhalb einer Gruppe wurden mittels One-Way analysis of variance (ANOVA) für wiederholte Messungen getestet. Diese wurde mit einem Student-Newman-Keuls post-hoc-Test kombiniert, um in den verglichenen Mittelwerten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen bestimmen und den α -Fehler korrigieren zu können. Als statistisch signifikant galt bei allen Analysen ein p-Wert $< 0,05$.

6 Ergebnisse

6.1 Wirkung von ES auf die Endometrioseherde

6.1.1 Dosierung

Während der Experimente wurden die Tiere der Kontrollgruppe mit 0,1 ml Maisöl (Vehikel) und die Tiere der Behandlungsgruppe mit 50 mg/kg ES behandelt. Bereits in früheren tierexperimentellen Studien zeigten Dosierungen zwischen 40-60 mg/kg ES erfolgversprechende anti-proliferative Wirkungen auf Tumorzellen [Umesalma und Sudhandiran, 2011; Cheng et al., 2017]. Die Verabreichung erfolgte bei den Tieren täglich intragastral mittels einer Knopfkanüle. Über den Zeitraum der Experimente zeigten die Tiere ein normales Fress- und Putzverhalten. Die Gewichtsentwicklung der Tiere wurde wöchentlich kontrolliert. Hierbei konnte ein Gewichtsverlust in den ersten Tagen nach der Induktion der Endometrioseherde mit darauffolgender stetiger Gewichtszunahme der Tiere beobachtet werden (Tab. 3). Dies lässt auf eine gute Verträglichkeit von ES schließen.

Tabelle 3: Gewicht (g) von ES- und Vehikel-behandelten BALB/c-Mäusen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 28 Tagen. Mittelwert $\pm$ SEM.

Tag [d]	Vehikel [g]	ES [g]
d0	18,91 $\pm$ 0,25	19,38 $\pm$ 0,33
d7	18,37 $\pm$ 0,30	18,01 $\pm$ 0,27
d14	19,54 $\pm$ 0,31	19,08 $\pm$ 0,29
d21	20,25 $\pm$ 0,27	19,42 $\pm$ 0,28
d28	20,98 $\pm$ 0,23	19,69 $\pm$ 0,27

6.1.2 Wachstum der Endometrioseherde

Zur Analyse des Wachstums der induzierten Endometrioseherde und deren Zystenbildung wurde ein hochauflösendes Ultraschallsystem verwendet. Die sonographischen Aufnahmen fanden einmal wöchentlich an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 statt. Dabei stellte sich das Stroma der Transplantate als echoreiche homogene Struktur dar, wohingegen sich die Zysten als echoleere homogene Areale präsentierten (Abb. 10A und B). An Tag 0 betrug das durchschnittliche Initialvolumen der Endometrioseherde ca. 1,2 mm³. Im weiteren Verlauf wurde eine kontinuierliche Volumenzunahme und demnach auch ein kontinuierliches Herdwachstum innerhalb der Vehikel-Gruppe beobachtet (Abb. 10C und D). Im Vergleich dazu stagnierte die Volumenzunahme bei den ES-behandelten Tieren ab Tag 7 bei ca. 1,6 mm³, sodass das Herdvolumen der ES-behandelten Tiere und der Vehikel-Tiere an Tag 21 signi-

fikant unterschiedlich war (Abb. 10C). Zurückzuführen ist dies auf eine signifikante Reduktion des Stromavolumens und des Stromawachstums ab Tag 7 bei den ES-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Abb. 10E und F). Während des gesamten Untersuchungszeitraumes zeigte sich weiterhin ein tendenziell geringeres Zystenvolumen in den ES-behandelten Tieren (Abb. 10G). Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der zystenenthaltenden Herde war in beiden Gruppen jedoch nicht nachweisbar (Abb. 10H).

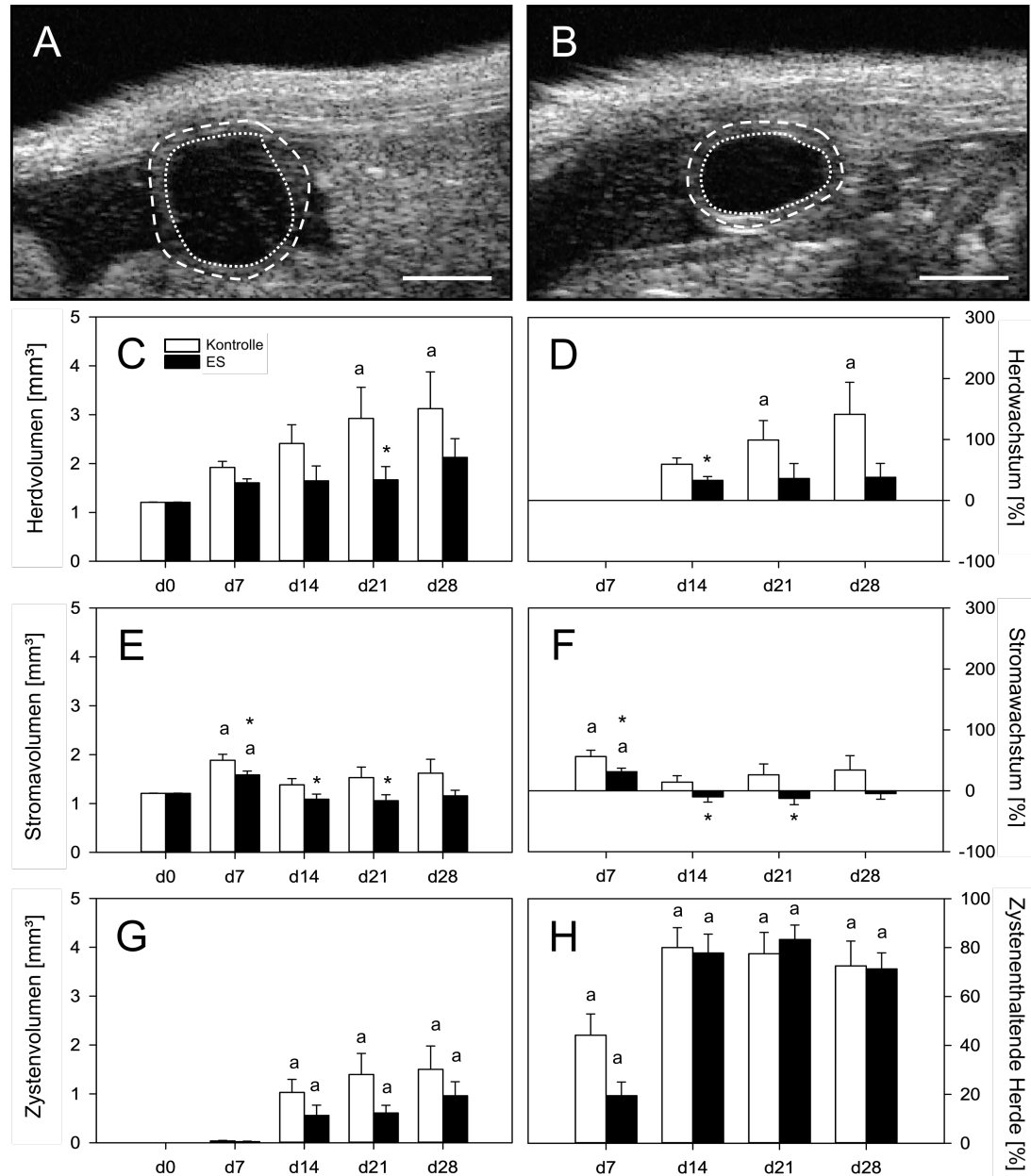


Abbildung 10: Sonographische Analyse der Endometrioseherde. **A, B:** Hochauflösende Ultraschallbildgebung von Endometrioseherden 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A) und einer ES-behandelten BALB/c-Maus (B) (Endometrioseherd markiert durch gestrichelte Linie; zystisch dilatierte Drüsen markiert durch gepunktete Linie). Maßstab: 1 mm. **C - H:** Herdvolumen [mm³] (C), Herdwachstum [%] (D), Stromavolumen [mm³] (E), Stromawachstum [%] (F), Zystenvolumen [mm³] (G) und Anteil der zystenenthaltenden Herde [%] (H) von Endometrioseherden an Tag 0, 7, 14, 21 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 10) und ES-behandelten (schwarze Säulen; n = 10) BALB/c-Mäusen. Mittelwerte $\pm$ SEM, *p < 0,05 vs. Kontrolle, ^ap < 0,05 vs. d0.

Zusätzlich zeigte sich bei der HE-Färbung und der Größenmessung mittels digitalem Messschieber eine tendenziell geringere Herdgröße bei den ES-behandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 11A – C). Dies bestätigt die Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung.

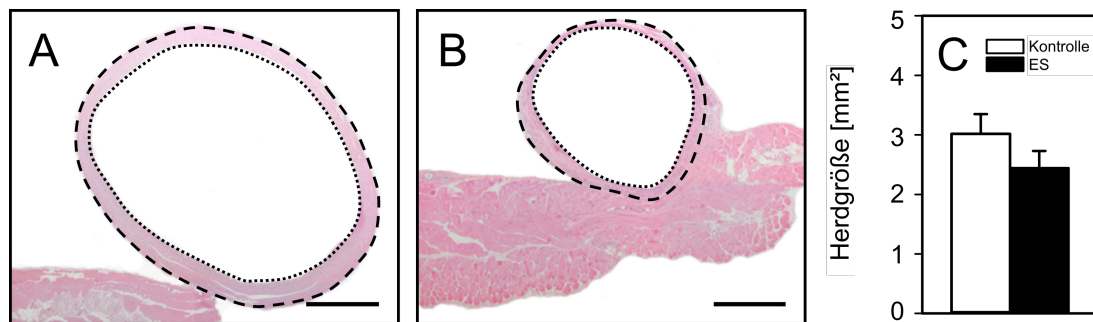


Abbildung 11: HE-Färbung und Größe der Endometrioseherde. **A, B:** HE-Färbung von Endometrioseherden 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A) und ES-behandelten BALB/c-Maus (B) (Endometrioseherd markiert durch gestrichelte Linie; zystisch dilatierte Drüsen markiert durch gepunktete Linie). Maßstab: 500 μm . **C:** Herdgröße [mm^2] der Endometrioseherde 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säule; $n = 10$) und ES-behandelten (schwarze Säule; $n = 10$) BALB/c-Mäusen. Mittelwerte $\pm$ SEM.

6.1.3 Vaskularisierung der Endometrioseherde

Die Gefäßdichte in den Endometrioseherden wurde an Tag 7 und 28 mittels immunhistochemischer CD31-Färbung bestimmt (Abb. 12A – E).

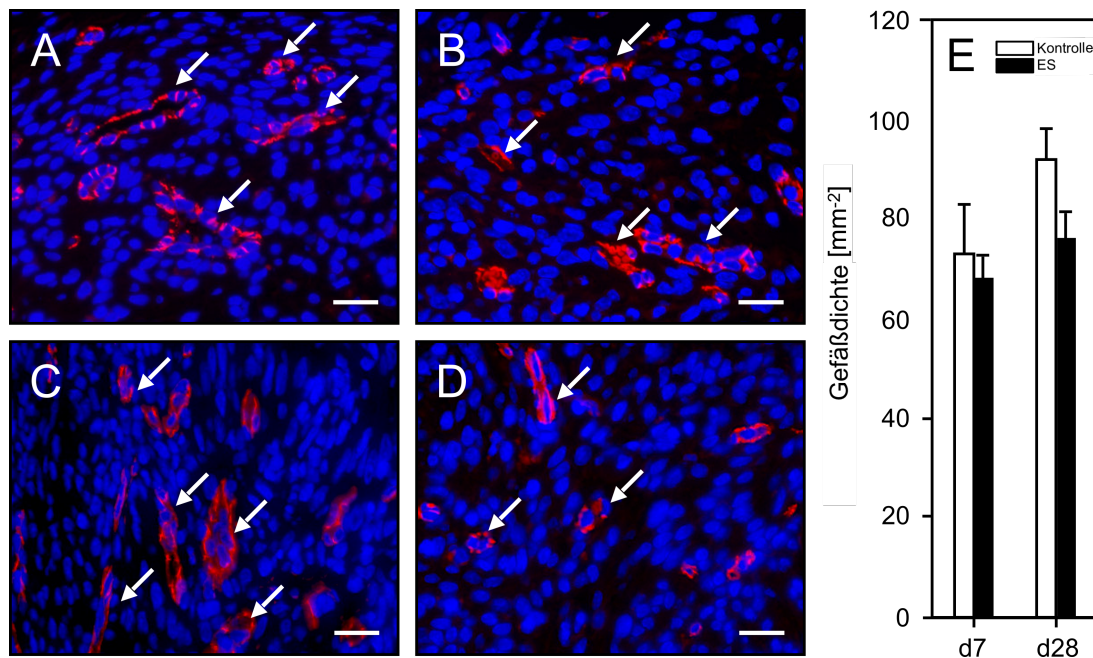


Abbildung 12: CD31-Immunfluoreszenzfärbung und Gefäßdichte der Endometrioseherde. **A - D:** Immunhistochemischer Nachweis CD31-positiver Gefäße in Endometrioseherden 7 Tage (A, B) und 28 Tage (C, D) nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A, C) und ES-behandelten BALB/c-Maus (B, D). Maßstab: 20 μm . **E:** Gefäßdichte [mm^{-2}] von Endometrioseherden an Tag 7 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; $n = 6 - 10$) und ES-behandelten (schwarze Säulen; $n = 6 - 10$) BALB/c-Mäusen.

Sowohl an Tag 7 als auch Tag 28 konnte kein signifikanter Unterschied in der Gefäßdichte zwischen der Vehikel-Gruppe und der ES-Gruppe gefunden werden (Abb. 12A – E). Dennoch zeigte sich eine tendenziell reduzierte Gefäßdichte in den ES-behandelten Herden.

6.1.4 Zellproliferation der Endometrioseherde

Um die Zellproliferation in den Endometrioseherden zu analysieren, kam als Proliferationsmarker Ki67 zum Einsatz [Kordek et al., 1996]. Die Proliferationsraten der Stroma- und Drüsenzellen in den Herden der Vehikel- und ES-behandelten Tiere wurden an Tag 7 und Tag 28 verglichen (Abb. 13A – E). An Tag 7 zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil proliferierender Zellen im Stromagewebe in der ES-behandelten Gruppe verglichen mit der Vehikel-Gruppe (Abb. 13A, B und E). Innerhalb der Drüsenzellen konnte an Tag 7 zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied in der zellulären Proliferation nachgewiesen werden (Abb. 13A, B und E). Gleichermaßen wiesen die Proliferationsraten der Stroma- und Drüsenzellen an Tag 28 zwischen der Behandlungs- und Vehikel-Gruppe keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 13C – E).

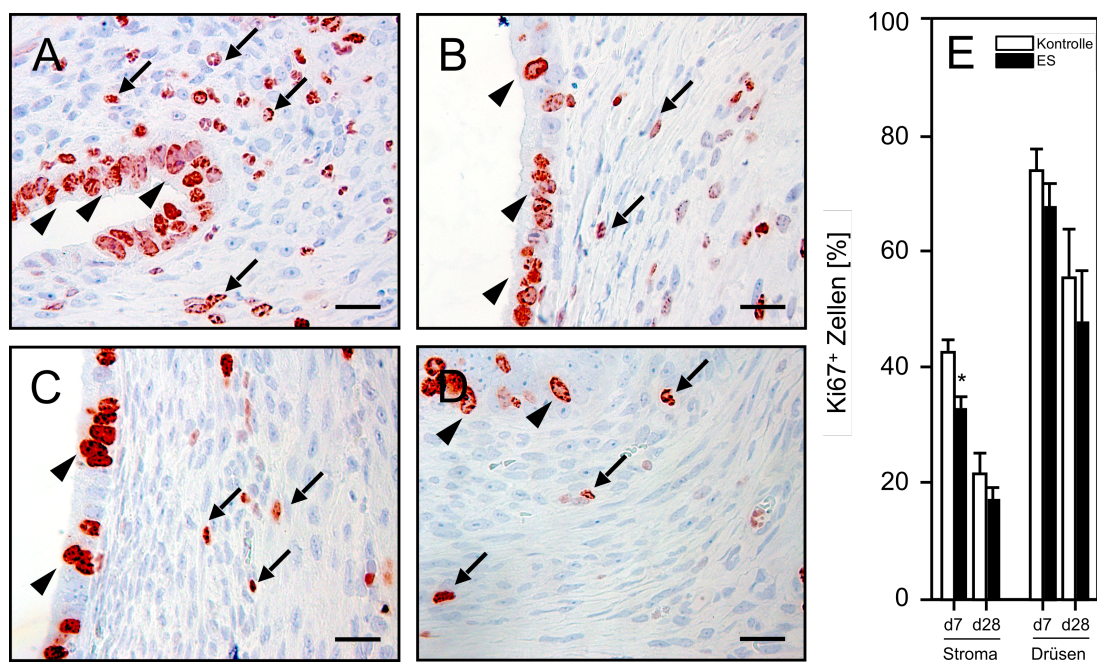


Abbildung 13: Ki67-Färbung und Zellproliferation der Endometrioseherde. **A - D:** Immunhistochemischer Nachweis Ki67-positiver Zellen in Endometrioseherden (Stromazellen: Pfeile; Drüsenzellen: Pfeilspitzen) 7 Tage (A, B) und 28 Tage (C, D) nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A, C) und ES-behandelten BALB/c-Maus (B, D). Maßstab: 20 μ m. **E:** Ki67⁺ Zellen [%] in Endometrioseherden an Tag 7 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 6 - 10) und ES-behandelten (schwarze Säulen; n = 6 - 10) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle.

6.1.5 Western Blot-Analysen der Endometrioseherde

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ES einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Stromazellen in den Endometrioseherden ausübt und tendenziell auch eine hem-

mende Wirkung auf die Vaskularisierung der Herde hat. Aufgrund dieser Beobachtungen sollten die zugrundeliegenden Mechanismen mit Hilfe von Western Blot-Analysen näher untersucht werden. Dazu wurde die relative Proteinexpression in % zur Kontrolle von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, AKT, pAKT, COX-2, PI3K, NF- κ B, ER- α und ER- β analysiert (Abb. 14A – L). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass ES die relative Expression von NF- κ B, VEGF und VEGFR2 in den Endometrioseherden signifikant erhöhte (Abb. 14D, F und G). Im Gegensatz dazu wurde die relative Proteinexpression von PI3K, pAKT/AKT, pERK/ERK, COX-2, ER- α und ER- β nicht durch ES beeinflusst (Abb. 14B, C, H, J, K und L).

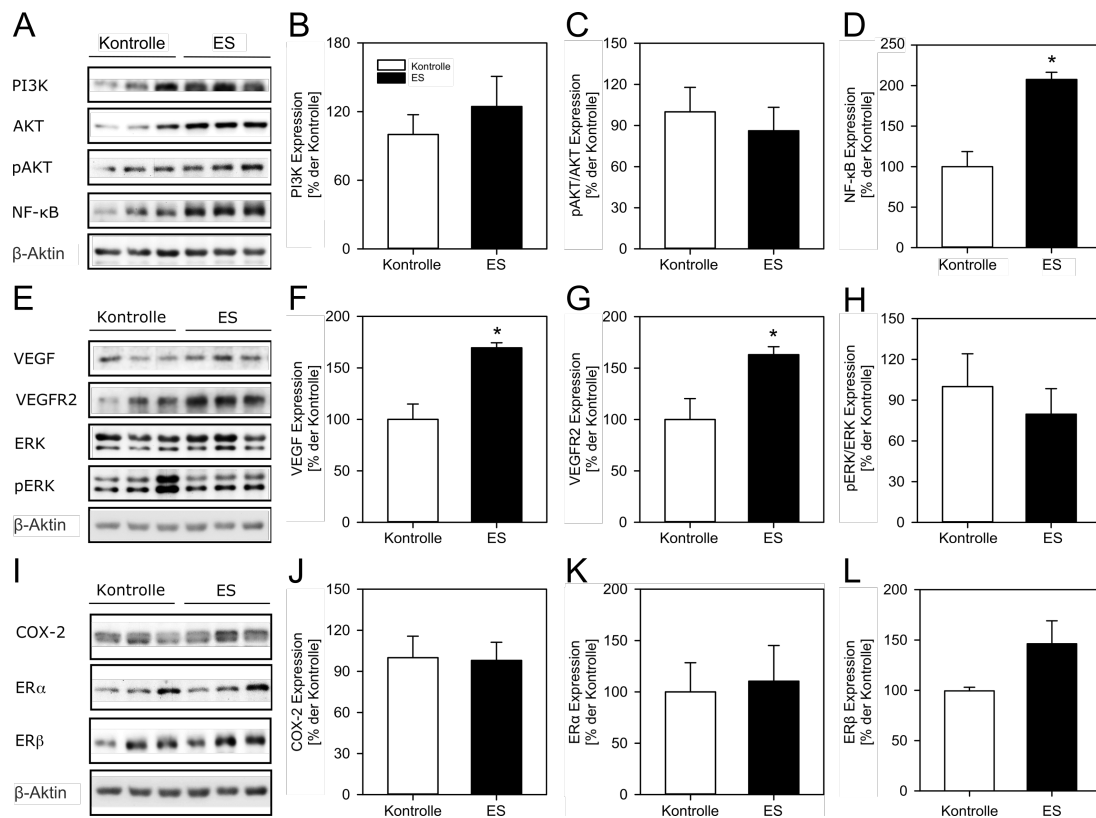


Abbildung 14: Expression verschiedener Proteine in den Endometrioseherden. **A:** Western Blots mit der Expression von PI3K, AKT, pAKT, NF- κ B und β -Aktin in Endometrioseherden 7 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle) und ES-behandelten BALB/c-Mäusen. **B - D:** Relative Proteinexpression [% der Kontrolle] von PI3K, pAKT/AKT und NF- κ B in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 3) und ES-behandelten (schwarze Säulen; n = 3) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle. **E:** Western Blots mit der Expression von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK und β -Aktin in Endometrioseherden 7 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle) und ES-behandelten BALB/c-Mäusen. **F - H:** Relative Proteinexpression [% der Kontrolle] von VEGF, VEGFR2 und pERK/ERK in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 3) und ES-behandelten (schwarze Säulen; n = 3) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle. **I:** Western Blots mit der Expression von COX-2, ER- α , ER- β und β -Aktin in Endometrioseherden 7 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle) und ES-behandelten BALB/c-Mäusen. **J - L:** Relative Proteinexpression [% der Kontrolle] von COX-2, ER- α und ER- β in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 3) und ES-behandelten (schwarze Säulen; n = 3) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM.

6.1.6 Wirkung auf Ovarien und Uteri

ES weist eine anti-östrogene Aktivität auf, die vor allem durch dessen Metaboliten Urolithin B vermittelt wird. So konnte nachgewiesen werden, dass Urolithin B *in vitro* die Produktion von Östrogenen in Brustkrebszellen der MCF-7 Linie hemmt und somit eine anti-proliferative Wirkung ausübt [Adams et al., 2010]. Zum Ausschluss eines möglichen anti-östrogenen Einflusses von ES auf die weiblichen Fortpflanzungsorgane wurden daher zusätzlich die Ovarien und Uteri der Mäuse mit Endometrioseherden mittels HE-, CD31- und Ki67-Färbung analysiert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Morphologie, Vaskularisierung und Zellproliferation in den Ovarien und Uteri der ES-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 15A – L).

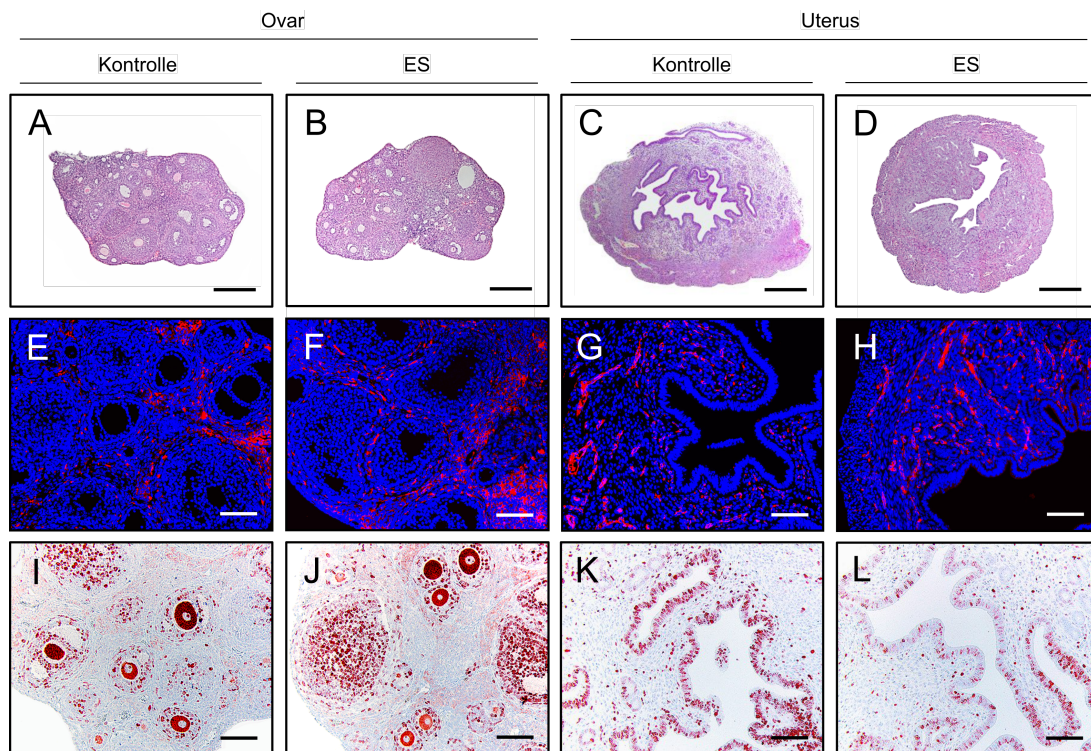


Abbildung 15: Histologische und immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten der Uteri und Ovarien von Mäusen mit Endometrioseherden. **A - D:** HE-Färbung der Ovarien (A, B) und Uteri (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (A, C) und ES-behandelten (B, D) BALB/c-Mäusen. Maßstab: 400 μ m. **E - H:** CD31-Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis CD31-positiver Gefäße in den Ovarien (E, F) und Uteri (G, H) 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (E, G) und ES-behandelten (F, H) BALB/c-Mäusen. Maßstab: 200 μ m. **I - L:** Ki67-Färbung zum Nachweis proliferierender Zellen in den Ovarien (I, J) und Uteri (K, L) 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (I, K) und ES-behandelten (J, L) BALB/c-Mäusen. Maßstab: 200 μ m.

6.2 Wirkung von I3C auf die Endometrioseherde

6.2.1 Dosierung

Während der Experimente wurden die Tiere der Kontrollgruppe mit 0,1 ml Maisöl (Vehikel) und die Tiere der Behandlungsgruppe mit 120 mg/kg I3C behandelt. Die Dosierung von 120 mg/kg I3C zeigte schon in früheren Studien einen hemmenden Effekt auf die Vaskularisierung von Tumoren [Lu et al., 2012]. Die Verabreichung erfolgte in beiden Gruppen einmal täglich intragastral mittels einer Knopfkanüle. Über den ganzen Zeitraum der Experimente konnte ein normales Fress- und Putzverhalten der Tiere beobachtet werden. Anhand der wöchentlichen Gewichtskontrollen zeigte sich zunächst ein Gewichtsverlust nach Induktion der Endometrioseherde in der Kontrollgruppe mit nachfolgender stetiger Gewichtszunahme der Tiere. In der I3C-Gruppe konnte der initiale Gewichtsverlust nicht beobachtet werden (Tab. 4). Aus diesen Gründen lässt sich auf eine gute Verträglichkeit von I3C schließen.

Tabelle 4: Gewicht (g) von I3C- und Vehikel-behandelten BALB/c-Mäusen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 28 Tagen. Mittelwert $\pm$ SEM.

Tag [d]	Kontrolle [g]	I3C [g]
d0	21,92 $\pm$ 0,46	20,22 $\pm$ 0,31
d7	21,20 $\pm$ 0,35	20,25 $\pm$ 0,21
d14	21,62 $\pm$ 0,35	20,58 $\pm$ 0,20
d21	22,07 $\pm$ 0,34	21,14 $\pm$ 0,23
d28	22,71 $\pm$ 0,38	21,77 $\pm$ 0,30

6.2.2 Wachstum der Endometrioseherde

Die Entwicklung von chirurgisch induzierten Endometrioseherden wurde wiederholt mittels hochauflösender Ultraschallbildgebung an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 untersucht. Die induzierten Endometrioseherde präsentierten sich mit echoarmen zystisch dilatierten Drüsen, die von echoreichem endometrialen Stroma umgeben waren (Abb. 16A und B). Während des 28-tägigen Beobachtungszeitraums konnte eine kontinuierliche Volumenzunahme und somit auch ein kontinuierliches Herdwachstum der Endometrioseherde innerhalb der Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 16C und D). Im Gegensatz dazu wuchsen die Endometrioseherde in den I3C-behandelten Mäusen im Verlauf kaum und wiesen daher an Tag 28 verglichen mit der Kontrollgruppe ein deutlich geringeres Herdvolumen und eine geringere Wachstumsrate auf (Abb. 16C und D). Dies war auf die Unterdrückung des Stromawachstums (Abb. 16E und F) zurückzuführen. Der Anteil der zystenenthaltenden Herde sowie das Zystenvolumen war jedoch in beiden Gruppen vergleichbar (Abb. 16G und H).

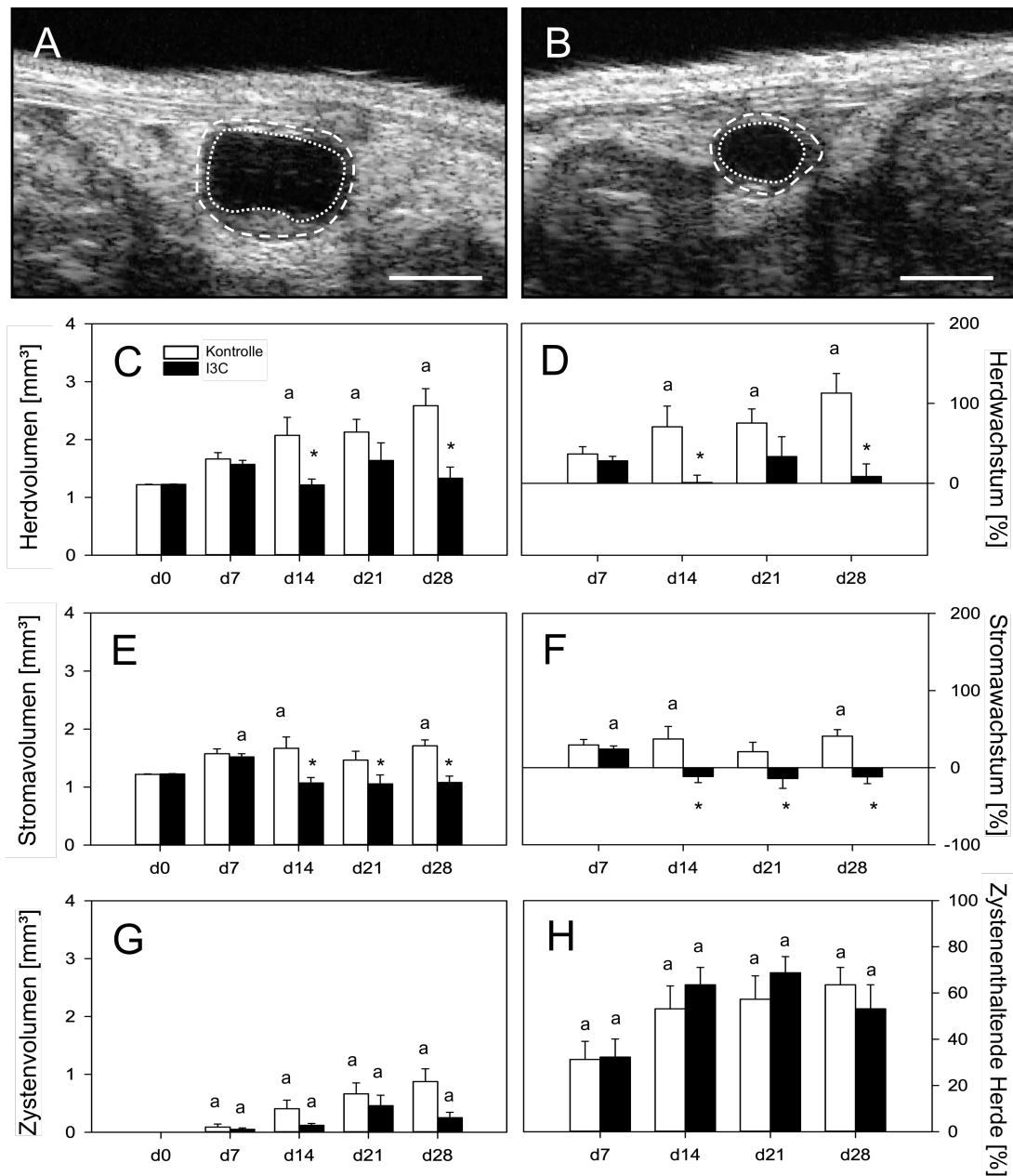


Abbildung 16: Sonographische Analyse der Endometrioseherde. **A, B:** Hochauflösende Ultraschallbildgebung von Endometrioseherden 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A) und einer I3C-behandelten BALB/c-Maus (B) (Endometrioseherd markiert durch gestrichelte Linie; zystisch dilatierte Drüsen markiert durch gepunktete Linie). Maßstab: 1 mm. **C - H:** Herdvolumen [mm³] (C), Herdwachstum [%] (D), Stromavolumen [mm³] (E), Stromawachstum [%] (F), Zystenvolumen [mm³] (G) und Anteil der zystenenthaltenden Herde [%] (H) von Endometrioseherden an Tag 0, 7, 14, 21 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 8) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; n = 8) BALB/c-Mäusen. Mittelwerte $\pm$ SEM, *p < 0,05 vs. Kontrolle, ^ap < 0,05 vs. d0.

Zusätzliche histologische Analysen bestätigten in beiden Gruppen die Entwicklung von Endometrioseherden, welche endometriale Stromazellen und Drüsenepithelzellen enthielten (Abb. 17A – B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Ultraschallbildgebung bestätigte sich an Tag 28 bei der Vermessung mit Hilfe des digitalen Messschiebers eine signifikant geringere Größe der Endometrioseherde bei den I3C-behandelten Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 17C).

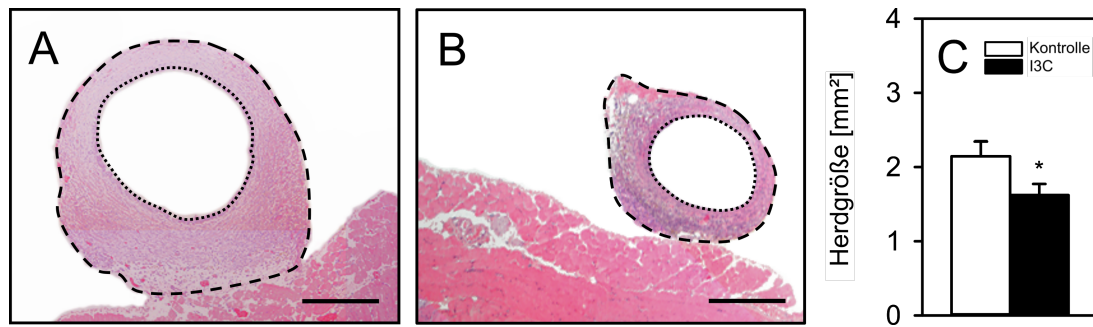


Abbildung 17: HE-Färbung und Größe der Endometrioseherde. **A, B:** HE-Färbung von Endometrioseherden 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A) und I3C-behandelten BALB/c-Maus (B) (Endometrioseherd markiert durch gestrichelte Linie; zystisch dilatierte Drüsen markiert durch gepunktete Linie). Maßstab: 400 μm . **C:** Herdgröße [mm^2] der Endometrioseherde 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säule; $n = 8$) und I3C-behandelten (schwarze Säule; $n = 8$) BALB/c-Mäusen. Mittelwerte $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

6.2.3 Vaskularisierung der Endometrioseherde

Da frühere Studien bereits eine anti-angiogene Wirkung von I3C nachweisen konnten, wurde auch in diesem Studienabschnitt die Gefäßdichte mit Hilfe einer CD31-Färbung analysiert (Abb. 18A – E).

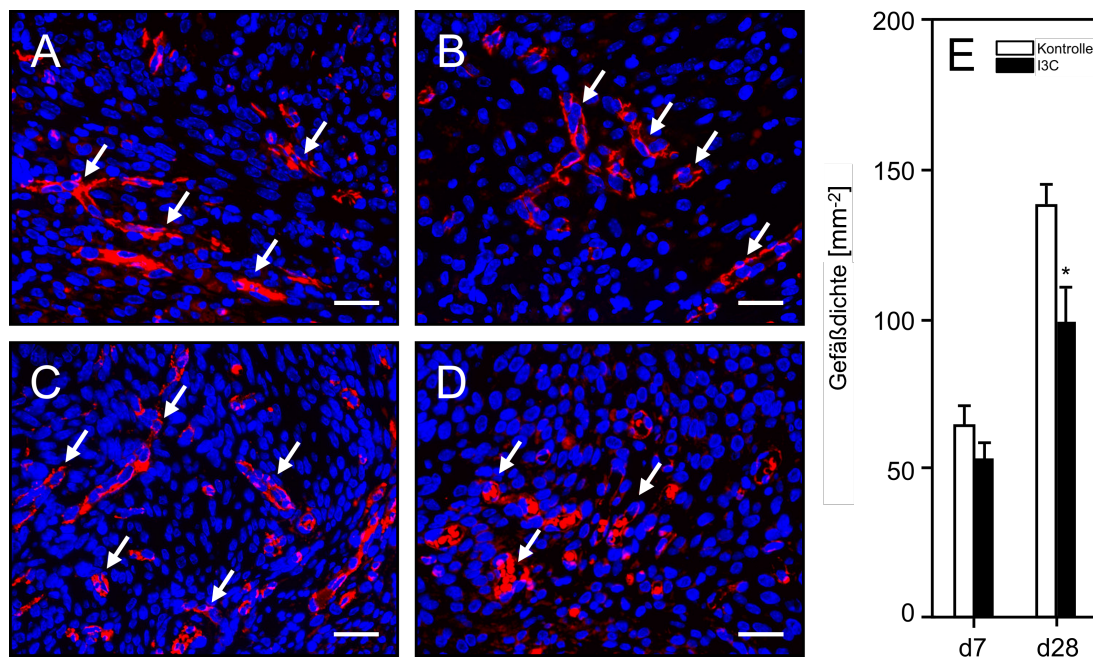


Abbildung 18: CD31-Immunfluoreszenzfärbung und Gefäßdichte der Endometrioseherde. **A - D:** Immunhistochemischer Nachweis CD31-positiver Gefäße von chirurgisch induzierten Endometrioseherden 7 Tage (A, B) und 28 Tage (C, D) nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A, C) und I3C-behandelten BALB/c-Maus (B, D). Maßstab: 20 μm . **E:** Gefäßdichte [mm^{-2}] von Endometrioseherden an Tag 7 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; $n = 6 - 8$) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; $n = 6 - 8$) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; * $P < 0,05$ vs. Kontrolle.

An Tag 7 zeigte sich hierbei kein erkennbarer Unterschied zwischen den Endometrioseherden der Behandlungs- und Kontrollgruppe (Abb. 18A, B und E). Im Gegensatz dazu wurde an Tag 28 eine reduzierte Gefäßdichte bei der I3C-Gruppe nachgewiesen (Abb. 18C – E).

6.2.4 Zellproliferation der Endometrioseherde

Zur Bestimmung der Proliferationsraten im Stroma sowie im Drüsenepithel der Endometrioseherde wurden Schnitte mit dem Proliferationsmarker Ki67 gefärbt (Abb. 19A – D). An Tag 7 wies das Stromagewebe in den I3C-behandelten Tieren eine signifikant reduzierte Anzahl Ki67-positiver Zellen auf (Abb. 19A, B und E). So betrug die Proliferationsrate $25,5 \pm 1,3\%$ in der I3C-Gruppe und $34,8 \pm 2,3\%$ in der Kontrollgruppe (Abb. 19E). Innerhalb des Drüsenepithels konnte an Tag 7 jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden (Abb. 19A, B und E). Im weiteren Verlauf konnte an Tag 28 ebenfalls kein Unterschied bezüglich der Proliferationsrate in den Herden von I3C-behandelten Tieren verglichen mit den Herden der Kontrolltiere nachgewiesen werden (Abb. 19C – E).

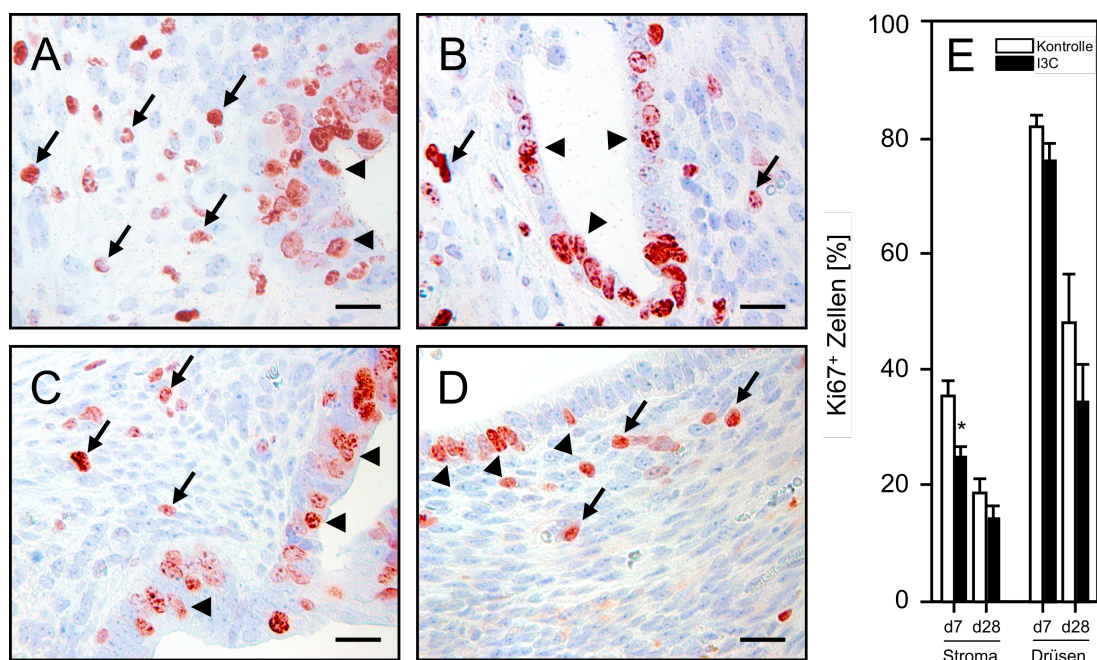


Abbildung 19: Ki67-Färbung und Zellproliferation der Endometrioseherde. **A - D:** Immunhistochemischer Nachweis Ki67-positiver Zellen in Endometrioseherden (Stromazellen: Pfeile; Drüsenzellen: Pfeilspitzen) 7 Tage (A, B) und 28 Tage (C, D) nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A, C) und I3C-behandelten BALB/c-Maus (B, D). Maßstab: 20 µm. **E:** Ki67⁺ Zellen [%] in Endometrioseherden an Tag 7 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 6 - 8) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; n = 6 - 8) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle.

6.2.5 Ki67/CD31-Doppelfärbung der Endometrioseherde

Aufgrund des inhibitorischen Effekts von I3C auf die Vaskularisierung der Endometrioseherde wurde zusätzlich eine immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung durchgeführt, welche die proliferierenden Ki67/CD31-positiven Endothelzellen markierte (Abb. 20A – D). Anhand dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass I3C die Proliferation der Gefäßendothelzellen in den I3C-behandelten Tieren nach 7 Tagen signifikant hemmt (Abb. 20A, B und E). Nach 28 Tagen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 20C – E).

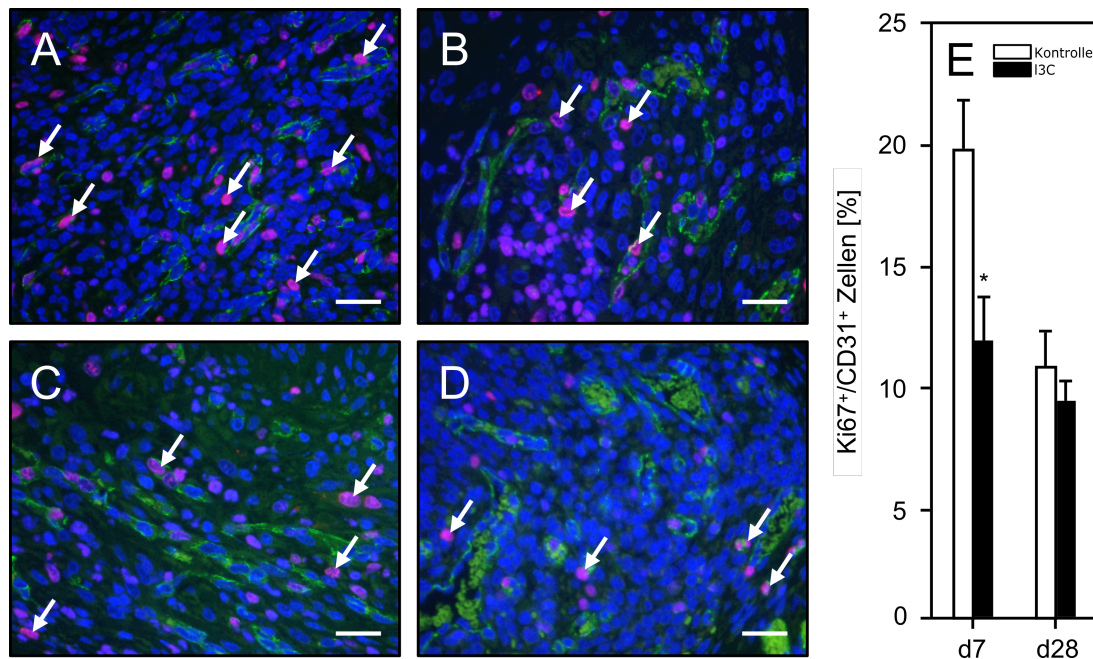


Abbildung 20: Ki67/CD31-Doppelfärbung und Endothelzellproliferation der Endometrioseherde. **A - D:** Immunhistochemischer Nachweis Ki67/-CD31-positiver Endothelzellen (Pfeile) in Endometrioseherden 7 Tage (A, B) und 28 Tage (C, D) nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum einer Vehikel-behandelten (A, C) und I3C-behandelten BALB/c-Maus (B, D). Maßstab: 20 μ m. **E:** Ki67⁺/CD31⁺ Zellen [%] von Endometrioseherden an Tag 7 und 28 nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 6 - 8) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; n = 6 - 8) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle.

6.2.6 Western Blot-Analysen der Endometrioseherde

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass I3C die Proliferation des Stromagewebes während der frühen Phase der Herdentwicklung inhibiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass I3C die Proliferation der Endothelzellen an Tag 7 sowie im weiteren Verlauf die Vaskularisierung der Herde im Vergleich zur Kontrolle an Tag 28 hemmt. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte der zugrundeliegende Mechanismus durch Bestimmung der Expression ausgewählter Proteine im Gewebe genauer untersucht werden. Dazu wurde die relative Proteinexpression in % der Kontrolle von PI3K, AKT, pAKT, NF- κ B, VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, COX-2, ER- α und ER- β mit Hilfe eines Western Blots bestimmt (Abb. 21A – L). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass I3C die Expression von PI3K, VEGFR2 und pERK/ERK im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant hemmt (Abb. 21B, G und H). Jedoch war die relative Proteinexpression von ER- α durch die Behandlung von I3C signifikant erhöht (Abb. 21K). Die Expression von pAKT/AKT, NF- κ B, VEGF, COX-2 und ER- β wurde von I3C nicht beeinflusst (Abb. 21C, D, F, J und L).

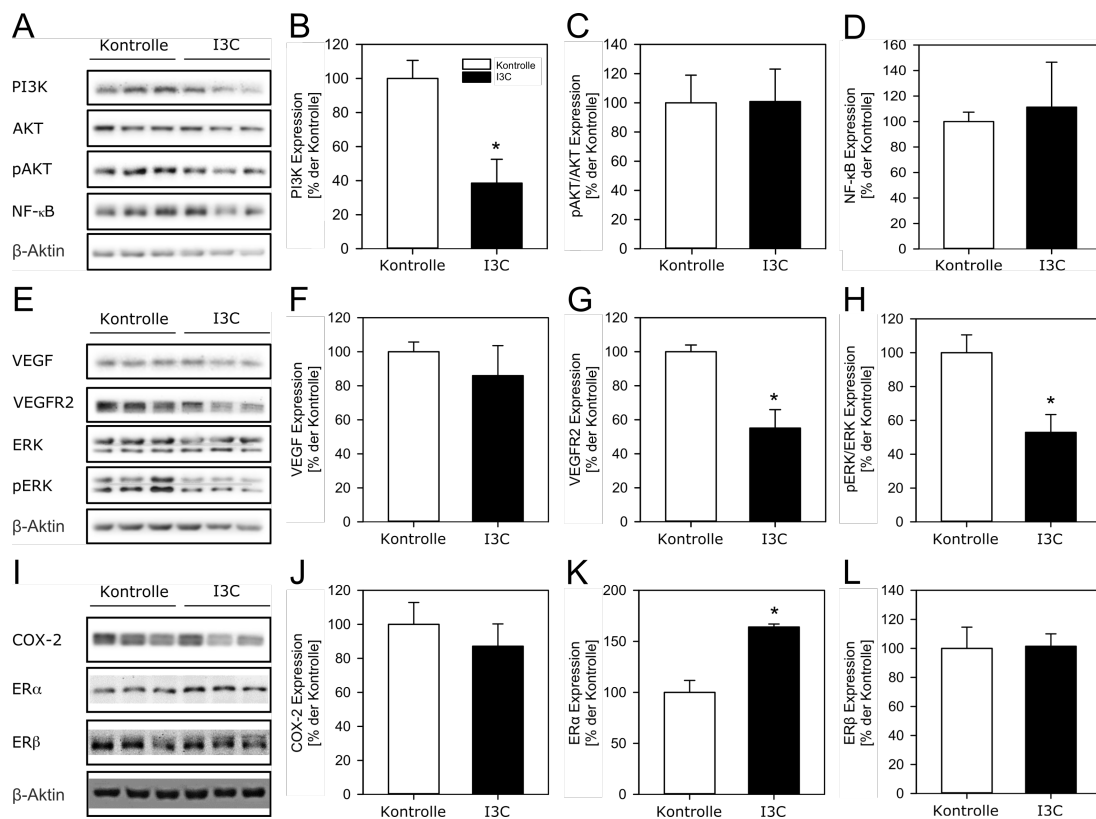


Abbildung 21: Expression verschiedener Proteine in den Endometrioseherden. **A:** Western Blots mit der Expression von PI3K, AKT, pAKT, NF- κ B und β -Aktin in Endometrioseherden 7 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle) und I3C-behandelten BALB/c-Mäusen. **B - D:** Relative Proteinexpression [% der Kontrolle] von PI3K, pAKT/AKT und NF- κ B in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 3) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; n = 3) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle. **E:** Western Blots mit der Expression von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK und β -Aktin in Endometrioseherden 7 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle) und I3C-behandelten BALB/c-Mäusen. **F - H:** Relative Proteinexpression [% der Kontrolle] von VEGF, VEGFR2 und pERK/ERK in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 3) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; n = 3) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle. **I:** Western Blots mit der Expression von COX-2, ER- α , ER- β und β -Aktin in Endometrioseherden 7 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (Kontrolle) und I3C-behandelten BALB/c-Mäusen. **J - L:** Relative Proteinexpression [% der Kontrolle] von COX-2, ER- α und ER- β in Endometrioseherden von Vehikel-behandelten (Kontrolle, weiße Säulen; n = 3) und I3C-behandelten (schwarze Säulen; n = 3) BALB/c-Mäusen. Mittelwert $\pm$ SEM; *P < 0,05 vs. Kontrolle.

6.2.7 Wirkung auf Ovarien und Uteri

Vorausgegangene Studien belegen eine anti-östrogene Wirkung von I3C, wobei ein Anstieg der 2-Hydroxyöstron-Konzentration beobachtet wurde [Michnovicz und Bradlow, 1990]. 2-Hydroxyöstron besitzt im Gegensatz zu Östradiol nur eine geringe östrogene Aktivität [Enríquez et al., 2016]. Aufgrund dessen sollte der hormonelle Einfluss von I3C auf die Ovarien und Uteri der Tiere genauer untersucht werden. Hierzu wurden die Ovarien und Uteri nach 28 Tagen exzidiert und histologisch aufbereitet (Abb. 22A – L). In der HE-Färbung zeigte sich kein Unterschied in der Morphologie zwischen den Geweben der Kontrollgruppe und den I3C-behandelten Tieren (Abb. 22A - D). Ebenso konnte eine vergleichbare Gefäßdichte (Abb. 22E - H) sowie Proliferationsrate (Abb. 22I - L) in den Ovarien (Abb. 22A, B, E, F, I und J) und Uteri (Abb. 22C, D, G, H, K und L) der Behandlungs- und

Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

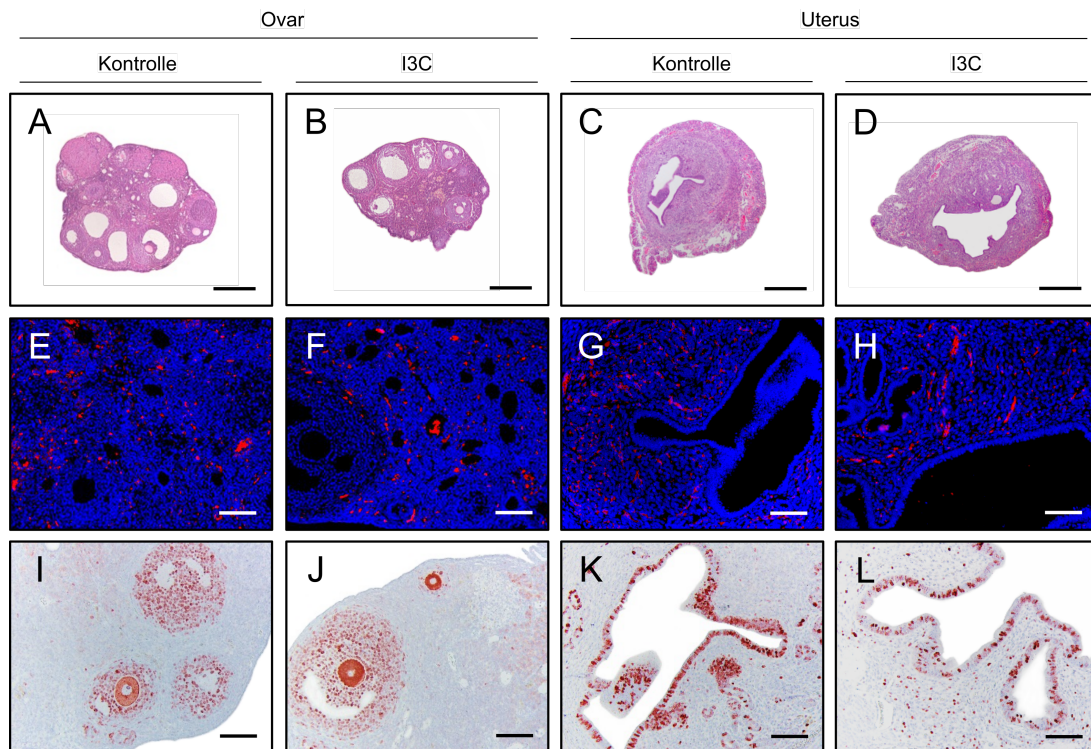


Abbildung 22: Histologische und immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten der Uteri und Ovarien von Mäusen mit Endometrioseherden. **A - D:** HE-Färbung der Ovarien (A, B) und Uteri (C, D) 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (A, C) und I3C-behandelten (B, D) BALB/c-Mäusen. Maßstab: 400 µm. **E - H:** CD31-Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis CD31-positiver Gefäße in den Ovarien (E, F) und Uteri (G, H) 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (E, G) und I3C-behandelten (F, H) BALB/c-Mäusen. Maßstab: 200 µm. **I - L:** Ki67-Färbung zum Nachweis proliferierender Zellen in den Ovarien (I, J) und Uteri (K, L) 28 Tage nach Transplantation von Uterusgewebe auf das Peritoneum von Vehikel-behandelten (I, K) und I3C-behandelten (J, L) BALB/c-Mäusen. Maßstab: 200 µm.

6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Studienabschnitt erstmalig die Wirkung von ES auf das Größenwachstum, die Vaskularisierung und die Zellproliferation von Endometrioseherden im Mausmodell analysiert. Hierbei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Das Größenwachstum der Endometrioseherde wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 28 Tagen mittels hochauflösenden Ultraschallaufnahmen untersucht. Dabei konnte gut zwischen Stroma und zystisch dilatierten Drüsen unterschieden werden. ES zeigte nach 21 Tagen eine signifikant inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Endometrioseherde, wobei vor allem das Stromawachstum durch die Behandlung mit ES inhibiert wurde.
2. Die quantitative Analyse Ki67-positiver Zellen zeigte, dass ES nach 7 Tagen auf die Stromazellen anti-proliferativ wirkte, wohingegen in den Drüsenzellen kein Effekt nachgewiesen wurde. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen an Tag 28 keinen Unterschied in der Anzahl Ki67-positiver Stroma- und Drüsenzellen in den ES-behandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe.
3. ES zeigte keine signifikant inhibitorische Wirkung auf die Vaskularisierung der Endometrioseherde. Jedoch war tendentiell eine Verringerung der Blutgefäßdichte detektierbar.
4. Mittels einer quantitativen Western Blot-Analyse konnten die Proteinexpressionen von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, AKT, pAKT, COX-2, PI3K und NF- κ B, welche an angiogenen, inflammatorischen und proliferativen Prozessen beteiligt sind, untersucht werden. Hierbei wurde nachgewiesen, dass ES die Expression von pERK/ERK, pAKT/AKT, COX-2 und PI3K nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von VEGF, VEGFR2 und NF- κ B durch ES signifikant gesteigert.
5. Die Expression der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β wurde ebenfalls mittels einer quantitativen Western Blot-Analyse bestimmt. ES hatte dabei auf die Expression beider Östrogenrezeptoren keinen signifikanten Einfluss.

In einem zweiten Studienabschnitt wurde erstmalig die Wirkung von I3C auf das Größenwachstum, die Vaskularisierung und die Zellproliferation von Endometrioseherden im Mausmodell analysiert. Hierbei konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1. Das Größenwachstum der Endometrioseherde wurde wöchentlich über einen Zeitraum von 28 Tagen mittels hochauflösenden Ultraschallaufnahmen untersucht. Dabei konnte gut zwischen Stroma und zystisch dilatierten Drüsen unterschieden werden. I3C konnte das Wachstum

- der induzierten Endometrioseherde nach 28 Tagen signifikant inhibieren, wobei vor allem das Stromawachstum durch die Behandlung mit I3C verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant gehemmt wurde.
2. Die quantitative Analyse Ki67-positiver Zellen zeigte, dass I3C nach 7 Tagen auf die Stromazellen anti-proliferativ wirkte, wohingegen in den Drüsenzellen kein Unterschied nachgewiesen wurde. Weiterhin ergaben die Untersuchungen an Tag 28 keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl Ki67-positiver Stroma- und Drüsenzellen in den I3C-behandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe.
 3. Nach 7 Tagen zeigte I3C keine inhibitorische Wirkung auf die Vaskularisierung der Endometrioseherde. Allerdings inhibierte I3C nach 28 Tagen die Vaskularisierung in den induzierten Endometrioseherden, was sich durch eine signifikant reduzierte Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte.
 4. Zur Analyse der anti-angiogenen Wirkung von I3C auf die Endothelzellproliferation wurden die induzierten Endometrioseherde zusätzlich mittels Ki67/CD31-Doppelfluoreszenzfärbung analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass I3C die Proliferation der Endothelzellen nach 7 Tagen signifikant inhibierte.
 5. Mittels einer quantitativen Western Blot-Analyse konnte die Expression von VEGF, VEGFR2, ERK, pERK, AKT, pAKT, COX-2, PI3K und NF- κ B, welche an angiogenen, inflammatorischen und proliferativen Prozessen beteiligt sind, untersucht werden. Hierbei konnte die Expression von VEGFR2, pERK/ERK und PI3K durch I3C inhibiert werden. Die Expression von VEGF, pAKT/AKT, COX-2 und NF- κ B wurde von I3C jedoch nicht beeinflusst.
 6. Die Expression der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β wurde ebenfalls mittels einer quantitativen Western Blot-Analyse bestimmt. Es konnte kein Effekt auf die ER- β -Expression bei den I3C-behandelten Endometrioseherden festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war die Expression von ER- α durch I3C signifikant erhöht.

7 Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Tierexperimentelle Endometriosemodelle

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Wirkung von ES und I3C auf Endometrioseherde im Mausmodell untersucht. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien konnten zuvor bereits nachweisen, dass beide Substanzen eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von unterschiedlichen Tumoren ausüben. So inhibierte ES die VEGF-induzierte Angiogenese und Zellproliferation in Backentaschentumoren in Hamstern, indem sie den PI3K/AKT-Signalweg blockierte [Kowshik et al., 2014]. I3C konnte beispielsweise die Angiogenese und das Wachstum von Prostatakarzinomzellen inhibieren [Souli et al., 2008]. Demzufolge sollten beide Substanzen ebenfalls das Wachstum von Endometrioseherden unterdrücken können. Die Endometriose unterliegt hormonellen Steuerungsmechanismen und geht häufig mit einer chronischen Inflammation einher [Weyerstahl und Stauber, 2007]. Daher sollte die Wirkung von ES und I3C auf Endometrioseherde in der vorliegenden Arbeit in einem tierexperimentellen *in vivo* Modell getestet werden, da dabei im Gegensatz zu *in vitro* Analysen diese systemischen Einflussfaktoren berücksichtigt werden.

Voraussetzung für die Entstehung einer Endometriose ist die Menstruation. Aus diesem Grund kommt die Erkrankung im Wesentlichen auch nur beim Menschen und in Primaten vor. Es erscheint daher als sinnvoll, Endometriose-Studien an Affen durchzuführen. Abgesehen von den großen ethischen Bedenken ist das Erkennen einer Endometriose in solchen Tieren jedoch aufgrund der erschwerten Diagnostik kompliziert und der Aufwand sowie die Kosten für die Haltung der Tiere sehr hoch. Im Laufe der Jahre wurden daher weitere Tiermodelle entwickelt, an denen die Pathogenese der Endometriose und neue Therapieansätze zur Behandlung der Erkrankung erforscht werden können [Grümmer, 2006].

Eines dieser Modelle ist das Modell der Chorioallantoismembran (CAM). Hierbei wird die mesenchymale Schicht der CAM aus Hühnereiern genutzt, um darauf zu untersuchende Zellen oder Gewebeproben zu transplantieren. So wurden bereits humane Endometriumzellen verwendet, die sich auf der CAM zu Endometriose-ähnlichen Herden entwickelten [Maas et al., 2001]. Ein großer Vorteil dieses Modells ist, dass die Anschaffung der Hühnereier und deren Unterbringung in Brutschränken weniger kostenintensiv ist als die Labortierhaltung [Fischer et al., 2022]. Des Weiteren lassen sich innerhalb kurzer Zeit bereits Ergebnisse generieren. So konnten in einem CAM-Modell schon nach wenigen Tagen erste Endometrioseherde aus humanen Endometriumzellen induziert werden [Maas et al., 2001]. Allerdings kann der inflammatorische Prozess, welcher oft mit einer Endometriose einher-

geht, im CAM-Modell nicht zufriedenstellend untersucht werden, da die Hühner-Embryonen in der frühen Entwicklung noch kein eigenes Immunsystem besitzen und so nicht zur Analyse immunologischer Prozesse geeignet sind [Fischer et al., 2022].

Ein weiteres Endometriose-Modell ist die Rückenhautkammer. Die Rückenhautkammer besteht aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen mit einem transparenten Fenster, die an der aufgespannten Rückenhautfalte der Versuchstiere fixiert werden. In das Fenster kann Gewebe transplantiert und seine Entwicklung makroskopisch und mikroskopisch beobachtet werden [Algire, 1943]. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurde das Rückenhautkammermodell weiterentwickelt und kontinuierlich verbessert. So fand es bereits Anwendung bei Ratten, Hamstern und Nacktmäusen [Papenfuss et al., 1979; Endrich et al., 1980; Lehr et al., 1993]. Schließlich wurde das Rückenhautkammermodell auch als neues Endometriosemodell bei Nagetieren etabliert, da es die wiederholte *in vivo* Analyse der Angiogenese in ektopem Endometriumgewebe mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht [Laschke et al., 2005]. Entsprechend konnten hiermit verschiedene anti-angiogene Substanzen erfolgreich getestet werden. So fanden Laschke et al. heraus, dass selektive COX-2-Inhibitoren [Laschke et al., 2007] oder Phytosubstanzen, wie 4-Hydroxybenzylalkohol [Laschke et al., 2011b], die Vaskularisierung sich neu entwickelnder Endometrioseherde hemmen. Dies zeigte sich während der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Endometrioseherde in der Rückenhautkammer in einer deutlich verringerten funktionellen Kapillardichte. Ein Vorteil des Rückenhautkammermodells ist dabei vor allem die Möglichkeit zur repetitiven mikroskopischen Visualisierung der Endometrioseherde zu beliebigen Zeitpunkten. Ein bedeutender Nachteil ist jedoch die begrenzte Untersuchungsdauer von ca. 14 Tagen, weil die Rückenhautkammer für längerfristige Beobachtungen nicht benutzt werden kann [Laschke et al., 2011a]. Des Weiteren entspricht das Rückenhautgewebe nicht den typischen Prädisloktionsstellen von Endometrioseherden im Bauchraum. So bleibt der Einfluss der Peritonealflüssigkeit, welche durch verschiedene inflammatorische Faktoren entscheidend zur Pathogenese der Endometriose beiträgt [Koninckx et al., 1998], unberücksichtigt. Um diesen Aspekt zu berücksichtigen und Analysen über einen längeren Beobachtungszeitraum durchführen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit daher das Modell der intraperitonealen Endometriose gewählt. In diesem Modell wird Endometriumgewebe eines Spenders direkt in die Bauchhöhle eines Empfängers transplantiert. Dabei wird zwischen heterologen und homologen Mausmodellen unterschieden [Grümmer, 2006].

Das heterologe Mausmodell kommt einer Xenotransplantation gleich, da das transplantierte Gewebe von einer anderen Spezies, z. B. dem Menschen, stammt [Grümmer, 2006]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass humanes Endometrium aus dem Uterus sowie Endometrium, welches aus menschlichem Menstrualblut gewonnen wurde, in der Peritonealhöhle von immundefizienten Mäusen erfolgreich anwachsen kann [Van Langendonck et al., 2004; Eggermont et al., 2005]. Auf der

einen Seite können auf diese Weise zelluläre Mechanismen und therapeutische Wirkstoffe direkt am menschlichen Endometrium untersucht werden. Auf der anderen Seite lässt sich eine derartige Xenotransplantation nur erfolgreich durchführen, wenn es sich um Tiere handelt, bei denen das Immunsystem geschwächt ist, damit es nicht zu Transplantatabstoßungen kommt. Infolge eines geschwächten Immunsystems ist die inflammatorische Reaktion der Versuchstiere auf das transplantierte Endometrium jedoch stark reduziert. Demnach können inflammatorische Einflussfaktoren, welche von großer Bedeutung für die Pathogenese der Endometriose sind, bei einer Xenotransplantation nicht berücksichtigt werden [Koninckx et al., 1998; Grümmer, 2006]. Passend dazu wurde in einer Studie berichtet, dass COX-2-Inhibitoren keinen Einfluss auf transplantiertes humanes Endometriumgewebe in immundefizienten Mäusen haben [Hull et al., 2005].

Homologe Mausmodelle, bei denen das zu transplantierende Gewebe von der gleichen Spezies stammt, lassen sich nochmals in autologe und syngene Modelle einteilen. Im autologen Modell wird das Endometrium eines Tieres in dessen eigene Peritonealhöhle transplantiert. Im syngenem Modell stammt das transplantierte Endometrium dagegen von einem anderen Spendertier, welches jedoch mit dem Empfängertier genetisch identisch ist. Ein entscheidender Vorteil des homologen Mausmodells im Vergleich zum heterologen Mausmodell ist die Tatsache, dass die Tiere ein physiologisches Immunsystem aufweisen. Demzufolge eignet sich das homologe Modell auch dazu, die Wirkung von immunmodulierenden oder anti-inflammatorischen Substanzen zu untersuchen [Grümmer, 2006]. So konnten bereits anti-inflammatorische Wirkstoffe, wie z. B. NSAID, die einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Endometrioseherde ausüben, erfolgreich getestet werden [Efsthathiou et al., 2005]. Ein weiterer Vorteil des homologen Mausmodells ist, dass Untersuchungen an großen Gruppen genetisch identischer Tiere durchführbar sind, was die Standardisierung erhöht. Außerdem können problemlos Langzeitstudien durchgeführt werden, die verhältnismäßig kostengünstig sind. Es sollte allerdings beachtet werden, dass sowohl im heterologen als auch im homologen Mausmodell der chirurgische Eingriff mittels Laparotomie zu einer Stress- und Entzündungsreaktion bei den Tieren führen kann. Des Weiteren können sich die unterschiedlichen Hormonkonzentrationen zwischen dem Spender- und Empfängertier bei syngenem Transplantationen nachteilig auf das Herdwachstum auswirken [Grümmer, 2006].

Für die Induktion intraperitonealer Endometrioseherde kommen verschiedene Transplantationstechniken zum Einsatz. Eine Möglichkeit ist es, Gewebeproben des Endometriums aus syngenem Spendertieren vom Myometrium zu trennen und als Suspension in einer Kochsalzlösung durch einen kleinen Einschnitt in die Peritonealhöhle der Empfängertiere zu injizieren [Somigliana et al., 1999]. Damit gelangt reines Endometriumgewebe ohne Myometrium in die Bauchhöhle, wo es an verschiedenen Strukturen anwachsen kann. Verfälschende Einflüsse durch mittransplantiertes Myometrium können

somit ausgeschlossen werden. Allerdings liegt dabei die sogenannte Anwachsrate, d. h. der Anteil der Transplantate, die sich nach erfolgter Injektion tatsächlich in Endometrioseherde entwickeln, bei nur ca. 30% [Grümmer, 2006]. Ebenso ist eine wiederholte Verlaufsbeobachtung der zufällig verteilten Endometrioseherde in der Bauchhöhle durch z. B. hochauflösende Ultraschallverfahren schwierig, da die Herde oftmals nicht gefunden werden können.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, uterine Gewebeproben mitsamt Endometrium und Myometrium direkt am Peritoneum eines Spendertieres mittels Naht zu fixieren. Als Nachteil sollte erwähnt werden, dass bei dieser Methode das Myometrium mittransplantiert wird, was bei einer echten Endometriose nicht der Fall wäre. Dadurch können falsch hohe Werte bei der Größenbestimmung der Transplantate gemessen werden. Allerdings erleichtert die Fixierung das Wiederauffinden der einzelnen Gewebeproben, wodurch eine zeitliche Verlaufsbeobachtung sehr gut durchführbar ist [Grümmer, 2006].

Unter Berücksichtigung der oben diskutierten Aspekte wurde in der vorliegenden Arbeit ein homologes Mausmodell angewendet, bei dem die Endometrioseherde mittels syngener Transplantation durch Fixierung uteriner Gewebeproben an das Peritoneum induziert wurden.

7.1.2 Ultraschall-Analyse

Endometrioseherde unterliegen ständigen Veränderungen in ihrem Wachstum. Insofern verändert sich auch ihr Anteil an vaskularisiertem Stroma und zystisch dilatierten Drüsen im zeitlichen Verlauf. Um den Therapieerfolg möglicher Substanzen zu evaluieren, ist deshalb eine kontinuierliche Kontrolle dieser Parameter über den gesamten Beobachtungszeitraum von großer Relevanz. Eine Möglichkeit der Größenmessung besteht darin, die Herde mit Hilfe eines Messschiebers manuell zu vermessen. Hierbei wird bei jedem Herd jeweils der Längs- und Querdurchmesser bestimmt. Anhand der Ellipsoidformel $d_1 \times d_2 \times \pi / 4$ kann schließlich die Größe der Endometrioseherde errechnet werden [Becker et al., 2006]. Allerdings ist für eine solche Messung jedesmal eine Laparotomie notwendig. Wiederholte Laparotomien bedeuten repetitive Stresssituationen für die Tiere und können inflammatorische Prozesse stimulieren, wodurch die Ergebnisse beeinflusst werden [Long et al., 2016]. Aus diesem Grund erscheint eine derartige Größenmessung eher am Ende des Versuchs als sinnvoll. Weiterhin weist nicht jeder Endometrioseherd eine ellipsoide Form auf und die Größenmessungen variieren stark je nach Untersucher.

Eine Möglichkeit der nichtinvasiven repetitiven Untersuchung von Endometrioseherden beruht auf dem Prinzip der Biolumineszenz [Wang et al., 2013]. Dabei werden Luziferase-exprimierende transgene Tiere verwendet, deren Endometriumgewebe in Luziferase-negative Wildtyp-Mäuse transplantiert wird. Durch intraperitoneale Injektion von Luziferin in die Luziferase-negativen Tiere wird das

Luziferin dann vermehrt in dem transplantierten Luziferase-exprimierenden Endometriumgewebe umgesetzt, wobei Photonen entstehen. Mittels einer speziellen Kamera kann nun diese Biolumineszenz in den Endometrioseherden detektiert werden [Becker et al., 2006]. Ähnliche Methoden, bei denen Tumorzellen oder injizierte Endometrioseherde mittels eines grün-fluoreszierenden Proteins unter Fluoreszenzbildgebung visualisiert werden konnten, wurden ebenfalls beschrieben [Hoffman, 2002; Hirata et al., 2005]. Vorteil der Biolumineszenz ist, dass mit einer hohen Sensitivität auch sehr kleine Endometrioseherde identifiziert werden können, die makroskopisch nicht zu erkennen wären. Jedoch kann es auch nach der Injektion von Luziferin zu Immunreaktionen auf das transplantierte Gewebe kommen, sodass das Signal der Biolumineszenz abgeschwächt wird. Folglich könnte dies die Untersuchungsergebnisse beeinflussen [Becker et al., 2006].

Alternativ kann eine Größenmessung von Endometrioseherden mittels MRT erfolgen. Diese Technik bietet eine hohe räumliche Auflösung mit einem hohen Weichteilkontrast, sodass unter Zuhilfenahme von Kontrastmittel auch entzündliche Prozesse detektiert werden können [Brockmann et al., 2007]. Aufgrund der guten Auflösung können die Volumina von Endometrioseherden exakt gemessen werden und korrelieren mit Messungen mittels Schieblehre [Silveira et al., 2013]. Um eine MRT an Mäusen durchführen zu können, sind jedoch spezielle Kleintier-MRTs mit sehr hoher Auflösung notwendig. Diese MRTs haben mit 4,7-16,4 Tesla relativ hohe Feldstärken und sind dementsprechend auch anfällig für Bildartefakte. Des Weiteren bringen diese Geräte lange Untersuchungszeiten mit sich und haben hohe Anschaffungskosten, weshalb sie nicht als Standardmethode zur Analyse verfügbar sind [Brockmann et al., 2007].

Eine Alternative zur MRT, welche mit geringeren Kosten verbunden ist, ist die Verwendung eines hochauflösenden Ultraschallgerätes. Hierbei können Endometrioseherde ebenfalls während der gesamten Studie nichtinvasiv analysiert werden. Im Vergleich zur MRT ist die Eindringtiefe beim Ultraschall durch die frequenzabhängige Dämpfung des Ultraschallimpulses jedoch begrenzt, sodass sich keine Ganzkörperschnittbilder darstellen lassen [Wirtzfeld et al., 2005]. Zudem ist das sonographische Auffinden einer Endometriose stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig [Brockmann et al., 2007; Laschke et al., 2010]. Dennoch beschreiben mehrere Studien eine sehr gute Darstellbarkeit von Endometrioseherden mit Differenzierung ihres Zysten- und Stromagewebes sowie eine gute Visualisierung der Adhäsionsbildung um die Herde im Ultraschall [Körbel et al., 2010; Laschke et al., 2010]. So kann das Größenwachstum der induzierten Endometrioseherde während des gesamten Beobachtungszeitraumes exakt bestimmt werden. In präklinischen Studien zur ultraschallbasierten Analyse von Tumorzellwachstum, bei denen eine exakte Größenmessung von hoher Relevanz war, konnte die Ultraschallanalyse ebenfalls erfolgreich eingesetzt werden [Beckmann et al., 2007]. Dabei korrelierten die Ultraschallergebnisse sehr gut mit den Tumordurchmessern, die bei der anschließenden Autopsie

gemessen wurden [Wirtzfeld et al., 2005]. Weitere entscheidende Vorteile des Ultraschalls sind auch die geringe Belastung für die Tiere, welche die volatilen Anästhetika für die kurze sonographische Untersuchung gut tolerieren. Außerdem kann die Anzahl der für eine Studie erforderlichen Tiere reduziert werden, da die Ultraschallbildgebung die statistische Variabilität begrenzt, indem die einzelnen Endometrioseherde wiederholt über die Zeit beobachtet werden können [Laschke et al., 2010]. Aufgrund der guten Beurteilbarkeit des Wachstums von transplantiertem Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten eignet sich die Sonographie somit als ideales Verfahren zur Untersuchung zukünftiger Therapieansätze in der Behandlung von sich entwickelnden Endometrioseherden. Hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit ein hochauflösendes Ultraschallsystem mit einem 40 MHz Ultraschallkopf, der bei einer Eindringtiefe von 6 mm Strukturen bis zu 30 μ m auflösen kann, verwendet.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 ES

ES ist ein Hydrolyseprodukt der Ellagitannine, welche als phenolische Verbindungen in verschiedenen Nahrungsmitteln vorkommen [Aguilar-Zárate et al., 2018]. Hierzu zählen Granatäpfel, Kakis, Himbeeren, Erdbeeren, Pflirsche, Pflaumen, Walnüsse, Mandeln und Wein [Derosa et al., 2016]. In mehreren Studien konnte ES bereits erfolgreich zur Prävention von chronisch-entzündlichen Erkrankungen, Diabetes und Tumorerkrankungen, wie z. B. dem Mammakarzinom, eingesetzt werden [Da Silva Pinto et al., 2010; Chen et al., 2015; Derosa et al., 2016]. Bei der Analyse der zugrundeliegenden Wirkmechanismen zeigten sich anti-oxidative, anti-inflammatorische, anti-proliferative, anti-angiogene und pro-apoptotische Eigenschaften von ES. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt die Applikation von ES eine potenzielle zukünftige Therapie für die Behandlung der Endometriose dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Dosis von 50 mg/kg ES verwendet. Dosierungen im Bereich von 40-60 mg/kg ES zeigten in früheren tierexperimentellen Studien bereits potente Effekte auf das Wachstum von Tumoren, ohne eine organschädigende Wirkung zu haben [Umesalma und Sudhandiran, 2011; Cheng et al., 2017]. Allerdings ist die Bioverfügbarkeit von ES aufgrund der schlechten Resorption und schnellen Elimination bei oraler Verabreichung vergleichsweise niedrig [Lei et al., 2003]. Die nicht-absorbierten Anteile von ES werden von der Darmflora im Kolon zu ihren Metaboliten, den Urolithinen, verstoffwechselt. Diesbezüglich ist bekannt, dass Urolithine ebenfalls sehr potente Wirkungen ausüben, da sie nach dem Verzehr von ES-haltigen Lebensmitteln in höheren Konzentrationen im Plasma zu finden sind. Vor allem Urolithin A wurde im menschlichen Plasma und Urin als Hauptmetabolit identifiziert [García-Villalba et al., 2013]. In einer *in vivo* Studie zu renaler Inflammation konnte Urolithin A mit Dosierungen von 50 mg/kg die Expression pro-inflammatorischer Zytokine stärker verringern als ES in der gleichen Dosierung [Guada et al., 2017]. Aufgrund

dieser Metabolisierung wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der orale Applikationsweg gewählt. Es ist daher anzunehmen, dass ES seine Wirkungen unter anderem durch seine potenten Metabolite ausübt, sodass auch bei niedrigeren Dosen relevante Effekte erzielt werden können [García-Villalba et al., 2013].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass ES das Wachstum von Endometrioseherden inhibiert. Dazu konnte in der Ultraschallbildgebung ein vermindertes Stromawachstum der induzierten Endometrioseherde in den mit ES-behandelten Tieren gemessen werden. Das verminderte Stromawachstum lässt sich auf eine frühe Hemmung der zellulären Proliferation zurückführen. Dies konnte mittels quantitativer Analysen Ki67-positiver Zellen in den Endometrioseherden nachgewiesen werden.

In der Literatur werden verschiedene anti-proliferative Signalwege beschrieben, welche von ES beeinflusst werden. Hierzu gehört der PI3K/AKT-Signalweg. Mehrere tierexperimentelle Studien konnten belegen, dass ES die Signaltransduktion von PI3K hemmt. Zudem inhibiert ES die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von AKT [Umesalma und Sudhandiran, 2011; Umesalma et al., 2015]. Dieser Mechanismus hat zur Folge, dass die Zellen nicht mehr vor Apoptose geschützt werden können [Nicholson und Anderson, 2002]. Demnach kann ES durch die Inaktivierung des PI3K/AKT-Signalweges zur Unterdrückung von Bcl-2 beitragen, was wiederum die Aktivierung der Apoptose begünstigt [Umesalma und Sudhandiran, 2011]. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Wirkmechanismus jedoch nicht bestätigt werden, da eine signifikante Herunterregulation der Expression von PI3K oder pAKT/AKT in Western Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren wird die Zellproliferation auch über den ERK-Signalweg gesteuert. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass ES die Phosphorylierung von ERK inhibiert und dadurch zur Proliferationshemmung beiträgt [Masamune et al., 2005; Eskandari et al., 2016]. Andere Studien zeigen jedoch, dass ES bei einer Dosierung von 10 µM keinen Effekt auf die ERK-Kinaseaktivität hat [González-Sarrías et al., 2010; Wang et al., 2016]. Mittels Western Blot-Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine signifikante Hemmung der Expression von pERK/ERK durch ES nachgewiesen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass ES nach 7 Tagen anti-proliferativ auf die Stromazellen des Endometriums wirkt. Im Hinblick darauf wurde in anderen Studien nachgewiesen, dass ES die Expression von Bax, Casp-3 und Cytochrom c erhöht und dadurch zur Induktion der Apoptose beiträgt [Umesalma et al., 2015]. Zudem kann ES die Proliferation auch über einen direkten inhibitorischen Effekt auf den Zellzyklus hemmen, was bereits in einer *in vitro* Studie an humanen Endometriumzellen beschrieben wurde [Mc Cormack et al., 2020]. Aus diesem Grund könnte ES auch in der vorliegenden Arbeit über einen direkten Zellzyklusarrest oder eine Induktion der Apoptose über den Casp-3-Signalweg zur Wachstumshemmung des Endometriums beigetragen haben. Dieser Me-

chanismus wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Die Pathogenese der Endometriose ist hochkomplex. Dabei spielt nicht nur die Proliferation von Gewebe, sondern auch die Angiogenese eine wichtige Rolle. Hierbei sind vor allem Wachstumsfaktoren von entscheidender Bedeutung [Carmeliet, 2000]. Bei Endometriose-Patientinnen ist nachweislich eine erhöhte Konzentration von VEGF im ektopen Endometriumgewebe vorhanden und trägt zum Wachstum von Endometrioseherden bei [Donnez et al., 1998]. Verschiedene *in vivo* Studien an Backentaschentumoren in Hamstern und an humanen Harnblasentumorzelllinien in Nacktmäusen konnten bereits belegen, dass ES die Expression von VEGF und VEGFR2 hemmt, wodurch folglich das Tumorstromawachstum inhibiert wurde [Kowshik et al., 2014; Ceci et al., 2016]. In der vorliegenden Arbeit war die Expression von VEGF und VEGFR2 durch die Behandlung mit ES jedoch signifikant erhöht. Dies wurde auch von Chatterjee et al. [2012] in einer Studie an Mäusen mit Magenulcera beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine 3-tägige Behandlung mit 10 mg/kg ES nach 7 Tagen zu einer Erhöhung von VEGF führte und damit zur aktiven Heilung der Magenulcera beitrug [Chatterjee et al., 2012]. Eine weitere *in vivo* Studie, in der die Wirkung von ES auf die Vaskularisierung von Knochendefekten getestet wurde, zeigte in den ersten 7 Tagen ebenfalls eine signifikante Erhöhung der VEGF-Expression bei ES-behandelten Tieren. Nach 14 Tagen wurde jedoch eine Verringerung der anfänglich erhöhten VEGF-Expression gemessen. Erklärt wurde dies damit, dass die VEGF-Expression nur in den ersten Tagen aufgrund der induzierten Angiogenese erhöht ist. Sobald sich jedoch ein Netzwerk an Blutgefäßen ausgebildet hat, reduziert sich auch wieder die anfänglich hohe VEGF-Expression, was als negative Rückkopplung betrachtet werden kann [Nirwana et al., 2022]. Dies könnte auch eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit anfänglich erhöhte VEGF-Expression in den ES-behandelten Endometrioseherden sein, obwohl nach 28 Tagen zwar keine Hemmung der Vaskularisierung, jedoch eine tendenziell reduzierte Gefäßdichte in diesen Herden gefunden wurde.

Ebenfalls von großer Bedeutung für das Wachstum von Endometrioseherden sind Entzündungsprozesse, da pro-inflammatorische Zytokine die Proliferation stimulieren können [Guo, 2007]. ES hat in vielen Studien aufgrund seiner Hemmung von z. B. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 ein anti-inflammatorisches Potential bewiesen [Chatterjee et al., 2012]. Daher wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analyse die Expression von COX-2 und NF- κ B in den Endometrioseherden nach Gabe von ES untersucht. In einigen *in vivo* Studien konnte bereits eine Reduktion der COX-2-Expression durch ES nachgewiesen werden [El-Shitany et al., 2014; Derosa et al., 2016]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einer tierexperimentellen Studie, an der die Wirkung von 7 mg/kg ES auf Magenulcera getestet wurde, eine vermehrte Expression von COX-2 [Chatterjee et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Einfluss von ES auf die COX-2-Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer *in vitro* Studie von González-Sarrías et al. [2010], die beschreibt, dass

ES keinen inhibitorischen Effekt auf die COX-2-Expression in humanen Kolonzellen hat. Es ist jedoch denkbar, dass Urolithine eine Hemmung der COX-2-Aktivität verursachen können, was bereits in einer Studie von Giménez-Bastida et al. [2020] nachgewiesen wurde. Diese zeigte, dass Urolithine, v.a. Urolithin A, bei Konzentrationen von 1-1,5 μM , welche im menschlichen Kolon auftreten können, die COX-2-Expression in Leukozyten herunterregulieren und somit eine entzündungshemmende Wirkung ausüben. Weitere Untersuchungen von Giménez-Bastida et al. [2020], bei denen die Wirkung von ES auf die COX-2-Expression untersucht wurde, ergaben jedoch keinen signifikanten Effekt.

Als weiterer pro-inflammatorischer Faktor wurde in der vorliegenden Arbeit NF- κ B untersucht. Mittels Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von NF- κ B in ES-behandelten Endometrioseherden signifikant erhöht ist. Dieses Ergebnis steht im deutlichen Gegensatz zu Studien, in denen entweder eine Inhibition oder keine Beeinflussung von NF- κ B durch ES beschrieben wurde [González-Sarrías et al., 2010; Cheng et al., 2017]. Möglich wäre, dass ES in der vorliegenden Arbeit eine pro-oxidative Wirkung ausübt, obwohl die Substanz als Antioxidans bekannt ist [Alfei et al., 2020]. Dazu bewies eine *in vitro* Studie an Tumorzellen, dass ES in Kombination mit Strahlung zur Erzeugung von ROS beitrug und so oxidativen Stress in den Zellen begünstigte [Bhosle et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit könnte die chirurgische Induktion der Endometrioseherde bei den Tieren oxidativen Stress fördern. Nachfolgend können durch den oxidativen Stress vermehrt pro-inflammatorische Zytokine stimuliert werden, was zu einer erhöhten Expression von NF- κ B führt. Eine erhöhte Expression von NF- κ B fördert schließlich die Apoptose [Siomek, 2012]. So konnte beispielsweise in einer *in vivo* Studie an Hepatozyten gezeigt werden, dass aktiviertes NF- κ B zur Stimulierung des Fas-Rezeptors führt und dadurch die Apoptose induziert [Kühnel et al., 2000]. Daher könnte ES in der vorliegenden Arbeit die Apoptose durch vermehrte Expression von NF- κ B gefördert haben, was schließlich zur Wachstumshemmung der Endometrioseherde führte.

In der Pathogenese der Endometriose sind außerdem die Östrogenrezeptoren von hoher Relevanz. Infolge lokal erhöhter Östrogenkonzentrationen in den Endometrioseherden binden Östrogene mit hoher Affinität an die Östrogenrezeptoren, welche dann als Transkriptionsfaktoren das Wachstum von Endometrioseherden fördern [Bulun et al., 2012]. Vor allem ER- β ist in erhöhten Konzentrationen in Endometrioseherden zu finden [Bulun et al., 2012]. In einer *in vitro* Studie an humanen Zervixkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass ES als Östrogenantagonist am ER- β wirkt, wobei ES gleichzeitig eine pro-östrogene Aktivität am ER- α zeigte [Papoutsis et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit waren jedoch weder ER- α noch ER- β signifikant durch ES beeinflusst. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer *in vitro* Studie von Gramec Skledar et al. [2019] überein, die nur eine vermehrte östrogene Aktivität am ER- α durch die Metabolite Urolithin A und B, nicht jedoch durch ES zeigte.

Um etwaige Nebenwirkungen von ES auf die Reproduktionsorgane auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Uteri und Ovarien untersucht. Hierbei ergaben sich keine morphologischen Unterschiede der Gewebe zwischen den ES-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Mit Hilfe einer CD31- und Ki67-Färbung konnte auch kein Effekt von ES auf die Vaskularisierung und die Proliferationsrate in den Ovarien und Uteri nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass ES das Wachstum von Endometrioseherden inhibiert. Zurückzuführen ist dies auf eine frühe Hemmung der stromalen Proliferation. Die konkreten Wirkmechanismen bleiben allerdings weitestgehend ungeklärt, wobei die Vermutung nahe liegt, dass ES über eine Stimulierung der NF- κ B-Aktivität zur Apoptose und somit zur Wachstumshemmung der Endometrioseherde beitrug. Weiterführende Studien sollten daher noch genauer klären, welche Mechanismen an dem anti-proliferativen Effekt von ES auf Endometrioseherde beteiligt sind.

7.2.2 I3C

I3C ist ein Pflanzeninhaltsstoff, der vor allem als Abbauprodukt in vielen Kohlgemüsesorten, wie Brokkoli, Rosenkohl und Blumenkohl, vorkommt [Schmandke, 2005]. I3C weist eine pro-apoptotische, anti-angiogene und anti-proliferative Aktivität auf [Auborn et al., 2003]. Demnach zeigen *in vitro* Studien, dass I3C und seine Derivate die Proliferation verschiedener Krebszelllinien, z. B. des Endometriums, unterdrücken [Leong et al., 2001; Howells et al., 2002]. Für ein besseres Verständnis dieser anti-kanzerogenen Wirkungen wurden verschiedene, von I3C vermittelte Signalwege, die auch in Bezug auf die Endmetriose von Relevanz sind, identifiziert. Hierzu zählt der PI3K/AKT- und der ERK-Signalweg [Ampofo et al., 2018]. Diese Signalwege regulieren bei der Endometriose zentrale Prozesse wie die Angiogenese [Groothuis et al., 2005]. Daher könnte I3C eine vielversprechende Substanz für die Behandlung der Endometriose sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere täglich mit einer Dosis von 120 mg/kg I3C über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen behandelt. Diese Dosis zeigte bereits in früheren Experimenten eine pro-apoptotische Wirkung auf Leukämiezellen [Lu et al., 2012]. Anhand der Formel zur Dosisumrechnung auf Basis der Körperoberfläche (Dosierung der Maus $\times$ Km-Faktor für eine Maus / Km-Faktor für einen Menschen) kann die bei der Maus verwendete Dosis in eine auf die menschliche Körperoberfläche angepasste Dosis umgerechnet werden [Reagan-Shaw et al., 2008]. Somit ergibt sich aus den applizierten 120 mg/kg bei der Maus eine humane Äquivalentdosis von 9,7 mg/kg, was ca. 679 mg I3C für eine 70 kg schwere Person entspricht. Dementsprechend befindet sich die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis im täglich empfohlenen Dosisbereich von 400-800 mg, welcher bereits in einer Phase-1-Studie an Frauen mit hohem Brustkrebsrisiko ohne starke Nebenwirkungen angewendet

wurde [Reed et al., 2005]. Auch in der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit konnte kein toxischer Effekt dieser Dosierung beobachtet werden. Die untersuchten Tiere zeigten postoperativ ein normales Fressverhalten. Über den gesamten Zeitverlauf der Applikation von I3C konnte zudem eine stetige Gewichtszunahme beobachtet werden.

Als Applikationsweg für I3C wurde in dieser Arbeit eine orale Gabe gewählt, die bereits in früheren Studien Anwendung fand. Dabei ist jedoch eine relativ hohe Dosierung von I3C notwendig, um effektive Plasmaspiegel zu erreichen, da die Substanz zügig verstoffwechselt und zum Großteil über die Leber eliminiert wird [Anderton et al., 2004]. Diesbezüglich konnte in einer pharmakokinetischen Studie an Menschen nachgewiesen werden, dass die Plasmakonzentration von DIM, einem der Hauptmetabolite von I3C, nach oraler Verabreichung von I3C wesentlich länger nachweisbar bleibt [Reed et al., 2006]. Im Gegensatz dazu ist die intraperitoneale Applikation von I3C nicht effektiv, da die Substanz in der Peritonealhöhle akkumuliert und daher nicht wie üblich im Darm metabolisiert werden kann [Park und Bjeldanes, 1992; Anderton et al., 2004]. Dies weist daraufhin, dass I3C als Prodrug agiert und dessen Effekte überwiegend durch seine Metabolite vermittelt werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass I3C das Wachstum von Endometrioseherden in einem Mausmodell inhibiert. Dabei konnte in der Ultraschallbildgebung ein vermindertes Stromawachstum der induzierten Endometrioseherde in den I3C-behandelten Tieren gemessen werden. Am Ende des Versuchszeitraumes wurde das verminderte Herdwachstum in den I3C-behandelten Tieren mit Hilfe eines digitalen Messschiebers bestätigt. Das reduzierte Stromawachstum lässt sich auf eine frühe Hemmung der stromalen zellulären und endothelialen Proliferation zurückführen. Dies konnte mittels quantitativer Analysen Ki67-positiver Zellen in den Endometrioseherden nachgewiesen werden.

Das Wachstum von Endometrioseherden ist stark von ihrer Vaskularisierung abhängig, da diese dazu beiträgt, die Herde mit Nährstoffen zu versorgen [Groothuis et al., 2005]. So ist bei der Entwicklung von Endometrioseherden eine hohe angiogene Aktivität charakteristisch [Laschke und Menger, 2018]. In dieser Arbeit konnte in der frühen Entwicklungsphase I3C-behandelter Endometrioseherde eine signifikant verminderte Endothelzellproliferation nachgewiesen werden. Infolgedessen wiesen die Herde am Ende des Beobachtungszeitraumes eine reduzierte Gefäßdichte auf. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von Souli et al. [2008] überein, in der ebenfalls nachgewiesen werden konnte, dass I3C die Endothelzellproliferation inhibiert. Ein möglicher zugrundeliegender Wirkmechanismus könnte die Inhibition pro-angiogen wirkender Zielmoleküle, wie ERK1/2 oder VEGF, sein [Kunimasa et al., 2010; Hajra et al., 2018].

Über Wachstumsfaktoren, wie VEGF, kann ERK aktiviert werden und stimuliert infolgedessen die Proliferation [Cross et al., 2003]. Mittels Western Blot-Analysen konnte in der vorliegenden Arbeit

sowohl eine signifikant reduzierte Expression von VEGFR2, als auch eine signifikant reduzierte Expression von pERK in den I3C-behandelten Tieren nachgewiesen werden. Somit lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass I3C über die Inhibierung dieses Signalweges zur Hemmung der Angiogenese und des Wachstums der Endometrioseherde beiträgt. Diese Wirkung von I3C bestätigte sich auch am Ende des Beobachtungszeitraumes durch eine signifikant reduzierte Gefäßdichte in der CD31-Färbung.

Ein weiterer möglicher Signalweg, welcher als Erklärung für die anti-proliferative Wirkung von I3C auf die Endometrioseherde dienen könnte, ist der PI3K/AKT-Signalweg. PI3K wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren an entsprechende Rezeptoren intrazellulär phosphoryliert und aktiviert anschließend AKT, wodurch einerseits die Zellproliferation stimuliert und andererseits die Apoptose gehemmt wird [Wymann and Pirola, 1998]. Im Vergleich zu gesunden Frauen lässt sich bei Endometriose-Patientinnen eine erhöhte Expression von PI3K und pAKT/AKT nachweisen, wodurch das Wachstum von Endometrioseherden gefördert wird [Madanes et al., 2020]. In vorherigen Studien konnte durch die Gabe von I3C eine signifikant verringerte Expression von PI3K gezeigt werden [Chinni und Sarkar, 2002; Ahmad et al., 2013]. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Durch die Behandlung mit I3C konnte ebenfalls eine signifikant reduzierte Expression von PI3K im Western Blot nachgewiesen werden, was demzufolge wahrscheinlich zur Wachstums- hemmung der Endometrioseherde beitrug.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Wirkung von I3C auf die Expression von AKT untersucht. Laut einer Studie von Chinni und Sarkar [2002] inhibiert I3C die Phosphorylierung von AKT, was mittels reduzierter AKT-Expression im Western Blot nachgewiesen wurde. Dadurch konnte die Apoptose in Prostatakrebszellen induziert werden [Chinni und Sarkar, 2002]. In der vorliegenden Arbeit war jedoch kein signifikanter Einfluss von I3C auf die Expression von pAKT/AKT nachweisbar. Ein ähnliches Ergebnis wird auch in einem *in vitro* Modell an Brustkrebszellen beschrieben, in dem I3C keine Auswirkungen auf die AKT-Expression hatte [Hung und Chang, 2009]. Da I3C in der vorliegenden Arbeit PI3K inhibierte, jedoch nicht die Expression von pAKT/AKT, liegt die Vermutung nahe, dass PI3K über AKT-unabhängige Signalwege, wie z. B. durch PDK1, seine anti-proliferativen Wirkmechanismen ausüben konnte [Faes und Dormond, 2015].

Des Weiteren hat I3C pro-apoptotische Eigenschaften, wie z. B. die Stimulierung von Bax, Casp-3, -8 und -9, oder die Inhibierung von CDK2, CDK6, Cyclin A, Cyclin E und Bcl-2 [Cover et al., 1998; Rahman et al., 2000; Lu et al., 2012]. Dadurch konnte I3C bereits die Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* inhibieren [Souli et al., 2008; Wang et al., 2013; Lee et al., 2019, 2021; Auborn et al., 2003]. Der Einfluss von I3C auf diese spezifischen apoptotischen Marker wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht genauer untersucht.

Die Endometriose ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung im Bauchraum. So konnten erhöhte Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und TNF- α , in Endometrioseherden nachgewiesen werden [Fakih et al., 1987; Halme et al., 1989]. Insbesondere ist die Expression von COX-2 in Endometrioseherden häufig erhöht [Bulun et al., 2012]. Die Expression von COX-2 unterliegt der Kontrolle von mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 und ERK. Diese Kinasen werden durch pro-inflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-1 β , aktiviert, was auf einen engen Zusammenhang zwischen Entzündung und Angiogenese bei der Endometriose hinweist [Huang et al., 2013; Laschke und Menger, 2018]. In der vorliegenden Studie wurde durch die Behandlung mit I3C jedoch kein signifikanter Einfluss auf COX-2 nachgewiesen, obwohl eine reduzierte Expression von pERK durch I3C gezeigt werden konnte. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis ist, dass die COX-2-Proteinexpression auch durch andere Signalwege, wie z. B. NF- κ B und AKT, reguliert werden kann [Takada et al., 2005; Lai et al., 2019].

Als pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktor reguliert NF- κ B die Expression bestimmter Zytokine und ist somit ebenfalls eng in Prozessen wie Proliferation und Angiogenese involviert [Guo, 2007; Nennig und Schank, 2017]. In einer Studie von Takada et al. [2005] wurde eine dosisabhängige Hemmung von aktiviertem NF- κ B durch I3C in verschiedenen Zelltypen beschrieben. Dabei inhibierte I3C NF- κ B über den AKT-Signalweg [Takada et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Einfluss von I3C auf die NF- κ B-Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen werden. Dies könnte auf die im Vergleich zur Kontrollgruppe unveränderte pAKT/AKT-Expression nach Gabe von I3C zurückzuführen sein, sodass dieser Signalweg nicht von I3C beeinflusst wurde.

Von entscheidender Bedeutung für das Wachstum der Endometriose ist die Expression der Östrogenrezeptoren im endometrialen Gewebe. So findet sich im eutopen Endometrium vorwiegend ER- α , während im ektopen Endometrium vermehrt ER- β exprimiert wird [Bulun et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant gesteigerte Expression von ER- α durch I3C nachgewiesen werden. Dahingegen wurde die ER- β -Expression nicht von I3C beeinflusst. Obwohl andere Studien zeigen, dass nur die erhöhten ER- α -Spiegel mit den gesteigerten pro-inflammatorischen Zytokinspiegeln in den Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose korrelieren [Montagna et al., 2008], konnte in der vorliegenden Arbeit keine vermehrte Expression der Inflammationsmarker NF- κ B und COX-2 durch die Behandlung mit I3C nachgewiesen werden. Vielmehr steht die erhöhte Expression von ER- α in Übereinstimmung mit einer Studie von Nouri Emamzaden et al. [2020], in welcher nach der Behandlung von Tripel-negativen Brustkrebszellen mit I3C eine Hochregulation von ER- α nachgewiesen werden konnte.

Der Östradiol-Metabolismus ist Cytochrom-P450-abhängig [Waxman, 1988]. I3C ist ein starker Induktor der Cytochrom-P450-Enzyme und stimuliert vor allem die Östradiol-2-Hydroxylase, wodurch

der 2-Hydroxyöstron-Spiegel gesteigert wird [Verhoeven et al., 1997]. 2-Hydroxyöstron hat eine abgeschwächte östrogene Wirkung im Brustdrüsen- und Endometriumgewebe sowie anti-inflammatorische, anti-proliferative und pro-apoptotische Eigenschaften [Martucci und Fishman, 1979; LaVallee et al., 2002; Xu et al., 2021]. Demzufolge kann I3C die östrogene Aktivität reduzieren, indem es dessen Verstoffwechselung zu inaktiven Östrogenmetaboliten, wie 2-Hydroxyöstron, unterstützt [Bradlow et al., 1991]. Dies könnte erklären, warum I3C in der vorliegenden Arbeit trotz eindeutig erhöhter ER- α -Expression die Entwicklung von Endometrioseherden hemmte.

Aufgrund der östrogenen Wirkung von I3C sollten in dieser Arbeit auch mögliche Nebenwirkungen auf die Reproduktionsorgane ausgeschlossen werden. Die histologische Untersuchung der Uteri und Ovarien mittels HE-, CD31- und Ki67-Färbung ergab zwischen Vehikel- und I3C-behandelten Tieren keinen Unterschied. Diese Ergebnisse stützen bisherige *in vivo* Studien, bei denen eine tägliche Dosis von 400 mg I3C keine relevanten Nebenwirkungen zeigte [Reed et al., 2005; Williams, 2021]. Bei diesen Studien war die Behandlungsdauer jedoch relativ kurz, sodass langfristige Nebenwirkungen, insbesondere in Bezug auf die Reproduktionsorgane, nicht klar ausgeschlossen werden konnten. Daher ist es wichtig, in zukünftigen Studien das genaue Risikoprofil von I3C bei einer dauerhaften Einnahme in Langzeitstudien zu ermitteln.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass I3C das Wachstum von Endometrioseherden *in vivo* hemmt. Dies ist auf eine frühe Hemmung der stromalen Proliferation und eine Inhibition der Angiogenese zurückzuführen. Insofern könnte I3C als ein neues Mittel zur Therapie der Endometriose in Betracht gezogen werden. In weiteren klinischen Studien müsste dafür noch geklärt werden, ob diese Ergebnisse auch auf den Menschen übertragbar sind und I3C ohne relevante Nebenwirkungen bei Endometriose-Patientinnen angewendet werden kann.

8 Literaturverzeichnis

1. **Abdelazeem KN, Singh Y, Lang F, Salker MS** (2017) Negative effect of ellagic acid on cytosolic pH regulation and glycolytic flux in human endometrial cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 41:2374-2382
2. **Adair T, Montani J** (eds) (2010) Angiogenesis. *Morgan & Claypool Life Sciences*, San Rafael, California, USA
3. **Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S** (2010) Pomegranate ellagitannin-derived compounds exhibit antiproliferative and antiaromatase activity in breast cancer cells in vitro. *Cancer Prev Res (Phila)* 3:108-113
4. **Adamson GD, Pasta DJ** (2010) Endometriosis fertility index: The new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* 94:1609-1615
5. **Aguilar-Zárate P, Wong-Paz JE, Buenrostro-Figueroa JJ, Ascacio JA, Contreras-Esquivel JC, Aguilar CN** (2018) Ellagitannins: Bioavailability, purification and biotechnological degradation. *Mini Rev Med Chem* 18:1244-1252
6. **Ahmad A, Biersack B, Li Y, Kong D, Bao B, Schobert R, Padhye S, Sarkar F** (2013) Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by indole compounds and their derivatives: Mechanistic details and biological implications for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 13:1002-1013
7. **Albrecht H** (1955) Die Endometriose. In: Seitz L, Amreich AI (eds): Biologie und Pathologie des Weibes, Bd. IV. *Urban & Schwarzenberg*, Berlin-Innsbruck-München-Wien, pp 190-288
8. **Alfei S, Marengo B, Zuccari G** (2020) Oxidative stress, antioxidant capabilities, and bioavailability: Ellagic acid or urolithins? *Antioxidants* 9:1-31
9. **Algire GH** (1943) An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4:1-11
10. **American Society for Reproductive Medicine** (1997) Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 67:817-821
11. **Ampofo E, Lachnitt N, Rudzitis-Auth J, Schmitt BM, Menger MD, Laschke MW** (2017) Indole-3-carbinol is a potent inhibitor of ischemia-reperfusion-induced inflammation. *J Surg Res* 215:34-46

12. **Ampofo E, Schmitt BM, Menger MM, Laschke MW** (2018) Targeting the microcirculation by indole-3-carbinol and its main derivate 3,3,-diindolylmethane: Effects on angiogenesis, thrombosis and inflammation. *Mini Rev Med Chem* 18:962-968
13. **Anderton MJ, Manson MM, Verschoyle RD, Gescher A, Lamb JH, Farmer PB, Steward WP, Williams ML** (2004) Pharmacokinetics and tissue disposition of indole-3-carbinol and its acid condensation products after oral administration to mice. *Clin Cancer Res* 10:5233-5241
14. **Attia GR, Zeitoun K, Edwards D, Johns A, Carr BR, Bulun SE** (2000) Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2897-2902
15. **Auborn KJ, Fan S, Rosen EM, Goodwin L, Chandraskaren A, Williams DE, Chen DZ, Carter TH** (2003) Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. *J Nutr* 133:2470S-2475S
16. **Audebert A, Petousis S, Margiouda-Siarkou C, Ravanos K, Prapas N, Prapas Y** (2018) Anatomic distribution of endometriosis: A reappraisal based on series of 1101 patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 230:36-40
17. **AWMF** (2013) Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose. *AWMF-Leitlinie Reg Nr. 015/045*
18. **Badawy SZ, Cuenca V, Marshall L, Munchback R, Rinas AC, Coble DA** (1984) Cellular components in peritoneal fluid in infertile patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 42:704-708
19. **Bai LY, Weng JR, Chiu CF, Wu CY, Yeh SP, Sargeant AM, Lin PH, Liao YM** (2013) OSU-A9, an indole-3-carbinol derivative, induces cytotoxicity in acute myeloid leukemia through reactive oxygen species-mediated apoptosis. *Biochem Pharmacol* 86:1430-1440
20. **Ballard KD, Seaman HE, De Vries CS, Wright JT** (2008) Can symptomatology help in the diagnosis of endometriosis? Findings from a national case-control study - Part 1. *BJOG* 115:1382-1391
21. **Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ** (2006) A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol* 168:2074-2084
22. **Beckmann N, Kneuer R, Gremlich H-U, Karmouty-Quintana H, Blé F-X, Müller M** (2007) In vivo mouse imaging and spectroscopy in drug discovery. *NMR Biomed* 20:154-185

23. **Benagiano G, Brosens I, Lippi D** (2014) The history of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 78:1-9
24. **Bhosle SM, Huilgol NG, Mishra KP** (2005) Enhancement of radiation-induced oxidative stress and cytotoxicity in tumor cells by ellagic acid. *Clin Chim Acta* 359:89-100
25. **Biswas SK** (2016) Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016:1-9
26. **Bradlow HL, Michnovicz JJ, Telang NT, Osborne MP** (1991) Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis* 12:1571-1574
27. **Brandenberger AW, Lebovic DI, Tee MK, Ryan IP, Tseng JF, Jaffe RB, Taylor RN** (1999) Oestrogen receptor (ER)- α and ER- β isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Mol Hum Reprod* 5:651-655
28. **Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfeleiderer A** (eds) (2008) Gynäkologie und Geburtshilfe, 5. Auflage, *Thieme*, Stuttgart, pp 205
29. **Brockmann MA, Kemmling A, Groden C** (2007) Current issues and perspectives in small rodent magnetic resonance imaging using clinical MRI scanners. *Methods* 43:79-87
30. **Brown J, Pan A, Hart R** (2010) Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 12
31. **Bruner-Tran KL, Osteen KG, Duleba AJ** (2009) Simvastatin protects against the development of endometriosis in a nude mouse model. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2489-2494
32. **Bruner-Tran KL, Osteen KG, Taylor HS, Sokalska A, Haines K, Duleba AJ** (2011) Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro. *Biol Reprod* 84:106-212
33. **Büchel S** (2021) Der NF-kappaB-Signalweg: Regulation zahlreicher Komponenten des Immunsystems und deren Beitrag zur Immunhomöostase. *Trillium Immunologie* 5:32-39
34. **Bulletti C, Coccia ME, Battistoni S, Borini A** (2010) Endometriosis and infertility. *J Assist Reprod Genet* 27:441-447
35. **Bulun SE, Fang Z, Imir G, Gurates B, Tamura M, Yilmaz B, Langoi D, Amin S, Yang S, Deb S** (2004) Aromatase and endometriosis. *Semin Reprod Med* 22:45-50

36. **Bulun SE, Monsavais D, Pavone ME, Dyson M, Xue Q, Attar E, Tokunaga H, Su EJ** (2012) Role of estrogen receptor- β in endometriosis. *Semin Reprod Med* 30:39-45
37. **Burnette WN** (1981) "Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203
38. **Burney RO, Giudice LC** (2012) Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril* 98:511-519
39. **Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA** (2012) Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 7:e35538
40. **Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigiannakis A, DeLisserHM** (2002) Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:1181-1190
41. **Cargnello M, Roux PP** (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:50-83
42. **Carmeliet P** (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395
43. **Ceci C, Tentori L, Atzori MG, Lacal PM, Bonanno E, Scimeca M, Cicconi R, Mattei M, De Martino MG, Vespasiani G, Miano R, Graziani G** (2016) Ellagic acid inhibits bladder cancer invasiveness and in vivo tumor growth. *Nutrients* 8:1-20
44. **Chatterjee A, Chatterjee S, Das S, Saha A, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK** (2012) Ellagic acid facilitates indomethacin-induced gastric ulcer healing via COX-2 up-regulation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44:565-576
45. **Chen HS, Bai MH, Zhang T, Li GD, Liu M** (2015) Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF- β /Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Oncol* 46:1730-1738
46. **Cheng H, Lu C, Tang R, Pan Y, Bao S, Qiu Y, Xie M** (2017) Ellagic acid inhibits the proliferation of human pancreatic carcinoma PANC-1 cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 8:12301-12310
47. **Chinni SR, Sarkar FH** (2002) Akt inactivation is a key event in indole-3-carbinol-induced apoptosis in PC-3 cells. *Clin Cancer Res* 8:1228-1236
48. **Chung MS, Han SJ** (2022) Endometriosis-associated angiogenesis and anti-angiogenic therapy for endometriosis. *Front Glob Womens Health* 3:1-11

49. **Cory S, Adams JM** (2002) The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656
50. **Coutinho LM, Ferreira MC, Rocha ALL, Carneiro MM, Reis FM** (2019) New biomarkers in endometriosis. *Adv Clin Chem* 89:59-77
51. **Cover CM, Hsieh SJ, Tran SH, Hallden G, Kim GS, Bjeldanes LF, Firestone GL** (1998) Indole-3-carbinol inhibits the expression of cyclin-dependent kinase-6 and induces a G1 cell cycle arrest of human breast cancer cells independent of estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 273:3838-3847
52. **Cramer DW, Missmer SA** (2002) The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955:11-22
53. **Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L** (2003) VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28:488-494
54. **Cullen T** (ed) (1896) Adenomyoma of the round ligament. *Johns Hopkins Hosp Bulletin* pp 1-8
55. **Cumiskey J, Whyte P, Kelehan P, Gibbons D** (2008) A detailed morphologic and immunohistochemical comparison of pre- and postmenopausal endometriosis. *J Clin Pathol* 61:455-459
56. **Da Silva Pinto M, De Carvalho JE, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K** (2010) Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) using in vitro models. *J Med Food* 13:1027-1035
57. **Delgado-Rosas F, Gómez R, Ferrero H, Gaytan F, Garcia-Velasco J, Simo C, Pellicer A** (2011) The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reproduction* 142:745-755
58. **Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A** (2016) Ellagic acid and its role in chronic diseases. *Adv Exp Med Biol* 928:473-479
59. **Dizerega GS, Barber DL, Hodgen GD** (1980) Endometriosis: Role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. *Fertil Steril* 33:649-653
60. **Donnez J, Donnez O, Orellana R, Binda MM, Dolmans MM** (2016) Endometriosis and infertility. *Panminerva Med* 58:143-150
61. **Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M** (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 13:1686-1690

62. **Donnez J, Squifflet J, Casanas-Roux F, Pirard C, Jadoul P, Van Langendonckt A** (2003) Typical and subtle atypical presentations of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 30:83-93
63. **Ebert AD** (ed) (2008) Endometriose - Ein Wegweiser für die Praxis. *De Gruyter*, Berlin, New York
64. **Edmonds D** (1996) Add-back therapy in the treatment of endometriosis: The European experience. *Br J Obstet Gynaecol* 103:10-13
65. **Efstathiou JA, Sampson DA, Levine Z, Rohan RM, Zurakowski D, Folkman J, D'Amato RJ, Rupnick MA** (2005) Nonsteroidal antiinflammatory drugs differentially suppress endometriosis in a murine model. *Fertil Steril* 83:171-181
66. **Eggermont J, Donnez J, Casanas-Roux F, Scholtes H, Van Langendonckt A** (2005) Time course of pelvic endometriotic lesion revascularization in a nude mouse model. *Fertil Steril* 84:492-499
67. **El-Shitany NA, El-Bastawissy EA, El-Desoky K** (2014) Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *Int Immunopharmacol* 19:290-299
68. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Meßmer K** (1980) Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177:125-134
69. **Enríquez J, Velázquez-Cruz R, ParraTorres A, Gutiérrez-Sagal R, Larrea F** (2016) The anti-estrogenic activity of indole-3-carbinol in neonatal rat osteoblasts is associated with the estrogen receptor antagonist 2-hydroxyestradiol. *J Endocrinol Invest* 39:1149-1158
70. **Eskandari E, Heidarian E, Amini S, Saffari-Chaleshtori J** (2016) Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells. *J Cancer Res Ther* 12:1266-1271
71. **Faes S, Dormond O** (2015) PI3K and AKT: Unfaithful partners in cancer. *Int J Mol Sci* 16:21138-21152
72. **Fakih H, Baggett B, Holtz G, Tsang KY, Lee JC, Williamson HO** (1987) Interleukin-1: A possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 47:213-217
73. **Farquhar C** (2007) Clinical review endometriosis. *BMJ* 334:249-253

74. **Fedele L, Bianchi S, Zanconato G, Portuese A, Raffaelli R** (2001) Use of a levonorgestrel-releasing intrauterine device in the treatment of rectovaginal endometriosis. *Fertil Steril* 75:485-488
75. **Feng D, Welker S, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW** (2012) Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 1:243-252
76. **Ferriani RA, Charnock-jones DS, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK** (1993) Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their mRNA by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 8:11-16
77. **Fischer D, Fluegen G, Garcia P, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Gribaldo L, Huang RY, Rasche V, Ribatti D, Rousset X, Pinto MT, Viallet J, Wang Y, Schneider-Stock R** (2022) The CAM model-Q&A with experts. *Cancers (Basel)* 15:1-26
78. **Floyd WS** (1980) Danazol: Endocrine and endometrial effects. *Int J Fertil* 25:75-80
79. **Folkman J** (1984) What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 51:601-604
80. **García-Niño WR, Zazueta C** (2015) Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacol Res* 97:84-103
81. **García-Villalba R, Beltrán D, Espín JC, Selma MV, Tomás-Barberán FA** (2013) Time course production of urolithins from ellagic acid by human gut microbiota. *J Agric Food Chem* 61:8797-8806
82. **Giménez-Bastida JA, González-Sarrías A, Espín JC, Schneider C** (2020) Inhibition of 5-lipoxygenase-derived leukotrienes and hemiketals as a novel anti-inflammatory mechanism of urolithins. *Mol Nutr Food Res* 64:e2000129
83. **González-Sarrías A, Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Dolara P, Espín JC** (2010) NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *Br J Nutr* 104:503-512
84. **Gramec Skledar D, Tomašič T, Sollner Dolenc M, Peterlin Mašič L, Zega A** (2019) Evaluation of endocrine activities of ellagic acid and urolithins using reporter gene assays. *Chemosphere* 220:706-713
85. **Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R** (2005) Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 8:147-156

86. **Grose KR, Bjeldanes LF** (1992) Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. *Chem Res Toxicol* 5:188-193
87. **Grubbs CJ, Steele VE, Casebolt T, Juliana MM, Eto I, Whitaker LM, Dragnev KH, Kelloff GJ, Lubet RL** (1995) Chemoprevention of chemically-induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. *Anticancer Res* 15:709-716
88. **Grümmer R** (2006) Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12:641-649
89. **Gruppo Italiano per lo Studio dell' Endometriosi** (2001) Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* 16:2668-2671
90. **Guada M, Ganugula R, Vadhanam M, Ravi Kumar MN** (2017) Urolithin A mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation and apoptosis in an experimental rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 363:58-65
91. **Guo SW** (2007) Nuclear factor- κ B (NF- κ B): An unsuspected major culprit in the pathogenesis of endometriosis that is still at large? *Gynecol Obstet Invest* 63:71-97
92. **Guo SW** (2009) Recurrence of endometriosis and its control. *Hum Reprod Update* 15:441-461
93. **Hadfield R, Mardon H, Barlow D, Kennedy S** (1996) Delay in the diagnosis of endometriosis: A survey of women from the USA and the UK. *Hum Reprod* 11:878-880
94. **Hajra S, Patra AR, Basu A, Saha P, Bhattacharya S** (2018) Indole-3-Carbinol (I3C) enhances the sensitivity of murine breast adenocarcinoma cells to doxorubicin (DOX) through inhibition of NF- κ B, blocking angiogenesis and regulation of mitochondrial apoptotic pathway. *Chem Biol Interact* 290:19-36
95. **Halban J** (1925) Hysteroadenosis metastatica. Die lymphogene Genese der sog. Adenofibromatosis heterotopica. *Archiv für Gynaekologie* 124:457-482
96. **Halis G, Kopf A, Mechsner S, Bartley J, Thode J, Ebert AD** (2006) Schmerztherapeutische Optionen bei Endometriose. *Deutsches Ärzteblatt* 103:1146-1155
97. **Halme J** (1989) Release of tumor necrosis factor- α by human peritoneal macrophages in vivo and in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 161:1718-1725
98. **Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM** (1984) Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64:151-154

99. **Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB** (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4:988-1004
100. **Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Morimoto C, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y** (2005) Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum Reprod* 20:2092-2096
101. **Hoffman RM** (2002) Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. *Lancet Oncol* 3:546-556
102. **Howells LM, Gallacher-Horley B, Houghton CE, Manson MM, Hudson EA** (2002) Indole-3-carbinol inhibits protein kinase B/Akt and induces apoptosis in the human breast tumor cell line MDA MB468 but not in the nontumorigenic HBL100 line. *Mol Cancer Ther* 1:1161-1172
103. **Huang F, Cao J, Liu Q, Zou Y, Li H, Yin T** (2013) MAPK/ERK signal pathway involved expression of COX-2 and VEGF by IL-1 β induced in human endometriosis stromal cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 6:2129-2136
104. **Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS** (2005) Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 20:350-358
105. **Hung W-C, Chang H-C** (2009) Indole-3-carbinol inhibits Sp1-induced matrix metalloproteinase-2 expression to attenuate migration and invasion of breast cancer cells. *J Agric Food Chem* 57:76-82
106. **Hwang IS, Lee J, Lee DG** (2011) Indole-3-carbinol generates reactive oxygen species and induces apoptosis. *Biol Pharm Bull* 34:1602-1608
107. **Jacobson TZ, Duffy JM, Barlow D, Koninckx PR, Garry R** (2009) Laparoscopic surgery for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD001300
108. **Jarrell J** (2004) Myofascial dysfunction in the pelvis. *Curr Pain Headache Rep* 8:452-456
109. **Javert CT** (1949) Pathogenesis of endometriosis based on endometrial homeoplasia, direct extension, exfoliation and implantation, lymphatic and hematogenous metastasis (including five case reports of endometrial tissue in pelvic lymph nodes). *Cancer* 2:399-410
110. **Jordão JBR, Porto HKP, Lopes FM, Batista AC, Rocha ML** (2017) Protective effects of ellagic acid on cardiovascular injuries caused by hypertension in Rats. *Planta Med* 83:830-836

111. **Juhasz-Böss I, Laschke MW, Müller F, Rosenbaum P, Baum S, Solomayer EF, Ulrich U** (2014) Endometriosis: Survey of current diagnostic and therapeutic options and latest research work. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 74:733-742
112. **Kang I, Buckner T, Shay NF, Gu L, Chung S** (2016) Improvements in metabolic health with consumption of ellagic acid and subsequent conversion into urolithins: Evidence and mechanisms. *Adv Nutr* 7:961-972
113. **Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Miura S, Sekine I, Ishimaru T** (2006) Peritoneal fluid and serum levels of hepatocyte growth factor may predict the activity of endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 85:458-466
114. **Khine YM, Taniguchi F, Nagira K, Nakamura K, Ohbayashi T, Osaki M, Harada T** (2018) New insights into the efficacy of SR-16234, a selective estrogen receptor modulator, on the growth of murine endometriosis-like lesions. *Am J Reprod Immunol* 80:1-10
115. **Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshiba H, Kitaoka Y, Honjo H** (2002) Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:149-155
116. **Knapp VJ** (1999) How old is endometriosis? Late 17th- and 18th-century european descriptions of the disease. *Fertil Steril* 72:10-14
117. **Kobayashi H, Kajihara H, Yamada Y, Tanase Y, Kanayama S, Furukawa N, Noguchi T, Haruta S, Yoshida S, Naruse K, Sado T, Oi H** (2011) Risk of carcinoma in women with ovarian endometrioma. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:529-539
118. **Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH** (1998) Endometriotic disease: The role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4:741-751
119. **Körbel C, Menger MD, Laschke MW** (2010) Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. *Hum Reprod* 25:2551-2558
120. **Kordek R, Biernat W, Alwasiak J, Liberski PP** (1996) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 immunopositivity in human astrocytic tumours. *Acta Neurochir (Wien)* 138:509-512
121. **Kotlyar A, Taylor H, DHooghe T** (2019) Use of immunomodulators to treat endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 60:56-65

122. **Kowshik J, Giri H, Kishore T, Kesavan R, Vankudavath R, Reddy G, Dixit M, Nagini S** (2014) Ellagic acid inhibits VEGF/VEGFR2, PI3K/Akt and MAPK signaling cascades in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *Anticancer Agents Med Chem* 14:1249-1260
123. **Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, Kubicka S** (2000) NF- κ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 275:6421-6427
124. **Kunimasa K, Kobayashi T, Kaji K, Ohta T** (2010) Antiangiogenic effects of indole-3-carbinol and 3,3-diindolylmethane are associated with their differential regulation of ERK1/2 and Akt in tube-forming HUVEC. *J Nutr* 140:1-6
125. **Kupfer MC, Schwimer SR, Lebovic J** (1992) Transvaginal sonographic appearance of endometriomata: Spectrum of findings. *J Ultrasound Med* 11:129-133
126. **Küpker W, Felberbaum RE, Krapp M, Schill T, Malik E, Diedrich K** (2002) Use of GnRH antagonists in the treatment of endometriosis. *Reprod Biomed Online* 5:12-16
127. **Küpker W, Schultze-Mosgau A, Diedrich K** (1998) Paracrine changes in the peritoneal environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update* 4:719-723
128. **Lai ZZ, Yang HL, Ha SY, Chang KK, Mei J, Zhou WJ, Qiu XM, Wang XQ, Zhu R, Li DJ, Li MQ** (2019) Cyclooxygenase-2 in endometriosis. *Int J Biol Sci* 15:2783-2797
129. **Landete JM** (2011) Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int* 44:1150-1160
130. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Menger MD** (2005) In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 84:1199-1209
131. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD** (2006a) Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149:137-144
132. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD** (2006b) Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum Reprod* 21:262-268
133. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B, Menger MD** (2007) Selective cyclooxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation

- of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87:163-171
134. **Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD** (2010) High-resolution ultrasound imaging: A novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol* 176:585-593
135. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD** (2011a) The dorsal skinfold chamber: Window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22:147-167
136. **Laschke MW, Vorsterman van Oijen AE, Scheuer C, Menger MD** (2011b) In vitro and in vivo evaluation of the anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol. *Br J Pharmacol* 163:835-844
137. **Laschke MW, Menger MD** (2018) Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update* 24:207-224
138. **LaVallee TM, Zhan XH, Herbstritt CJ, Kough EC, Green SJ, Pribluda VS** (2002) 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation and induces apoptosis independently of estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 62:3691-3697
139. **Lee CM, Park SH, Nam MJ** (2019) Anticarcinogenic effect of indole-3-carbinol (I3C) on human hepatocellular carcinoma SNU449 cells. *Hum Exp Toxicol* 38:136-147
140. **Lee JY, Lim HM, Lee CM, Park SH, Nam MJ** (2021) Indole-3-carbinol inhibits the proliferation of colorectal carcinoma LoVo cells through activation of the apoptotic signaling pathway. *Hum Exp Toxicol* 40:2099-2112
141. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062
142. **Lei F, Xing DM, Xiang L, Zhao YN, Wang W, Zhang LJ, Du LJ** (2003) Pharmacokinetic study of ellagic acid in rat after oral administration of pomegranate leaf extract. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 796:189-194
143. **Leong H, Firestone GL, Bjeldanes LF** (2001) Cytostatic effects of 3,3-diindolylmethane in human endometrial cancer cells result from an estrogen receptor-mediated increase in transforming growth factor- α expression. *Carcinogenesis* 22:1809-1817

144. **Levander G, Normann P** (1955) The pathogenesis of endometriosis an experimental study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 34:366-398
145. **Leyendecker G, Kunz G, Noe M, Herbertz M, Mall G** (1998) Endometriosis: A dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 4:752-762
146. **Leyendecker G, Wildt L, Mall G** (2009) The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: Tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet* 280:529-538
147. **Long Q, Liu X, Guo SW** (2016) Surgery accelerates the development of endometriosis in mice. *Am J Obstet Gynecol* 215:320.e1-320.e15
148. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
149. **Lu HF, Tung WL, Yang JS, Huang FM, Lee CS, Huang YP, Liao WY, Chen YL, Chung JG** (2012) In vitro suppression of growth of murine WEHI-3 leukemia cells and in vivo promotion of phagocytosis in a leukemia mice model by indole-3-carbinol. *J Agric Food Chem* 60:7634-7643
150. **Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, De Goeij AF, Struijker-Boudier HA, Evers JL** (2001) Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 16:627-631
151. **Madanes D, Bilotas MA, Bastón JI, Singla JJ, Meresman GF, Barañao RI, Ricci AG** (2020) PI3K/AKT pathway is altered in the endometriosis patient's endometrium and presents differences according to severity stage. *Gynecol Endocrinol* 36:436-440
152. **Maia H Jr, Haddad C, Pinheiro N, Casoy J** (2012) Advantages of the association of resveratrol with oral contraceptives for management of endometriosis-related pain. *Int J Womens Health* 4:543-549
153. **Martucci CP, Fishman J** (1979) Impact of continuously administered catechol estrogens on uterine growth and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 105:1288-1292
154. **Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Satoh K, Shimosegawa T** (2005) Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 70:869-878
155. **Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Yokomizo R, Noda T, Kimura Y, Okamura K** (2001) Erythropoietin concentrations are elevated in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 16:945-948

156. **Mc Cormack BA, Bilotas MA, Madanes D, Ricci AG, Singla JJ, Barañao RI** (2020) Potential use of ellagic acid for endometriosis treatment: Its effect on a human endometrial cell cycle, adhesion and migration. *Food Funct* 11:4605-4614
157. **McCawley LJ, Matrisian LM** (2001) Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13:534-540
158. **Mechsner S, Schwarz J, Thode J, Loddenkemper C, Salomon DS, Ebert AD** (2007) Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions. *Fertil Steril* 88:581-587
159. **Meng Q, Yuan F, Goldberg ID, Rosen EM, Auborn K, Fan S** (2000) Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor- α signaling in human tumor cells. *J Nutr* 130:2927-2931
160. **Meresman GF, Götte M, Laschke MW** (2021) Plants as source of new therapies for endometriosis: A review of preclinical and clinical studies. *Hum Reprod Update* 27:367-392
161. **Mettler L, Schmutzler A** (eds) (2007) Endometriose. Gynäkologie und Geburtshilfe, *Springer*, Berlin, pp 299-311
162. **Meyer R** (1919) Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im Allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *Zentralbl Gynäkol* 43:745-750
163. **Michnovicz JJ, Bradlow HL** (1990) Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. *J Natl Cancer Inst* 82:947-949
164. **Minelli L, Fanfani F, Fagotti A, Ruffo G, Ceccaroni M, Mereu L, Landi S, Pomini P, Scambia G** (2009) Laparoscopic colorectal resection for bowel endometriosis: Feasibility, complications, and clinical outcome. *Arch Surg* 144:234-239
165. **Montagna P, Capellino S, Villaggio B, Remorgida V, Ragni N, Cutolo M, Ferrero S** (2008) Peritoneal fluid macrophages in endometriosis: Correlation between the expression of estrogen receptors and inflammation. *Fertil Steril* 90:156-164
166. **Montanari E, Rolla M, Hudelist G** (2020) Endometriosedagnostik mittels Vaginalultraschall - eine Übersicht. *J Gynäkol Endokrinol* 30:90-96
167. **Naiki-Ito A, Chewonarin T, Tang M, Pitchakarn P, Kuno T, Ogawa K, Asamoto M, Shirai T, Takahashi S** (2015) Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. *Prostate* 75:151-160

168. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Maas JW, Dunselman GA, De Goeij AF, Evers JL** (2003) Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 18:30-34
169. **Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GAJ, Bouma-Ter Steege JCA, Thijssen VLJL, Evers JLH, Groothuis PG** (2004) Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1089-1095
170. **Nap AW, Dunselman GA, Griffioen AW, Mayo KH, Evers JL, Groothuis PG** (2005) Angiostatic agents prevent the development of endometriosis-like lesions in the chicken chorioallantoic membrane. *Fertil Steril* 83:793-795
171. **Nennig SE, Schank JR** (2017) The role of NF- κ B in drug addiction: Beyond inflammation. *Alcohol Alcohol* 52:172-179
172. **Newman PJ** (1997) The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99:3-8
173. **Nicholson KM, Anderson NG** (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14:381-395
174. **Nirwana I, Munadziroh E, Yuliati A, Fadhila AI, Nurliana, Wardhana AS, Shariff KA, Surboyo MDC** (2022) Ellagic acid and hydroxyapatite promote angiogenesis marker in bone defect. *J Oral Biol Craniofac Res* 12:116-120
175. **Nothnick WB** (2010) Endometriosis: In search of optimal treatment. *Minerva Ginecol* 62:17-31
176. **Nouri Emamzaden F, Word B, Cotton E, Hawkins A, Littlejohn K, Moore R, Miranda-Carbon G, Orish CN, Lyn-Cook B** (2020) Modulation of estrogen α and progesterone receptors in triple negative breast cancer cell lines: The effects of vorinostat and indole-3-carbinol in vitro. *Anticancer Res* 40:3669-3683
177. **Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Baraňao RI, Meresman G** (2011) The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 96:428-433
178. **Oosterlynck DJ, Cornillie FJ, Waer M, Vandeputte M, Koninckx PR** (1991) Women with endometriosis show a defect in natural killer activity resulting in a decreased cytotoxicity to autologous endometrium. *Fertil Steril* 56:45-51
179. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA** (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18:311-318

180. **Papoutsi Z, Kassi E, Tsiapara A, Fokialakis N, Chrousos GP, Moutsatsou P** (2005) Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of ellagic acid via the estrogen receptor subtypes ERalpha and ERbeta. *J Agric Food Chem* 53:7715-7720
181. **Park JY, Bjeldanes LF** (1992) Organ-selective induction of cytochrome P-450-dependent activities by indole-3-carbinol-derived products: Influence on covalent binding of benzo[a]pyrene to hepatic and pulmonary DNA in the rat. *Chem Biol Interact* 83:235-247
182. **Ping J, Li JT, Liao ZX, Shang L, Wang H** (2011) Indole-3-carbinol inhibits hepatic stellate cells proliferation by blocking NADPH oxidase/reactive oxygen species/p38 MAPK pathway. *Eur J Pharmacol* 650:656-662
183. **Proctor M, Latthe P, Farquhar C, Khan K, Johnson N** (2005) Surgical interruption of pelvic nerve pathways for primary and secondary dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD001896
184. **Rahman KM, Aranha O, Glazyrin A, Chinni SR, Sarkar FH** (2000) Translocation of Bax to mitochondria induces apoptotic cell death in indole-3-carbinol (I3C) treated breast cancer cells. *Oncogene* 19:5764-5771
185. **Rana P, Kazmi I, Singh R, Afzal M, Al-Abbasi FA, Aseeri A, Singh R, Khan R, Anwar F** (2013) Ectopic pregnancy: A review. *Arch Gynecol Obstet* 288:747-757
186. **Rawson JM** (1991) Prevalence of endometriosis in asymptomatic women. *J Reprod Med* 36: 513-515
187. **Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N** (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659-661
188. **Reed GA, Arneson DW, Putnam WC, Smith HJ, Gray JC, Sullivan DK, Mayo MS, Crowell JA, Hurwitz A** (2006) Single-dose and multiple-dose administration of indole-3-carbinol to women: Pharmacokinetics based on 3,3-diindolylmethane. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:2477-2481
189. **Reed GA, Peterson KS, Smith HJ, Gray JC, Sullivan DK, Mayo MS, Crowell JA, Hurwitz A** (2005) A phase I study of indole-3-carbinol in women: Tolerability and effects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1953-1960
190. **Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA** (1992) Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 6:886-892

191. **Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Meresman GF, Barañao RI** (2011) Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci* 18:614-622
192. **Ríos JL, Giner RM, Marín M, Recio MC** (2018) A pharmacological update of ellagic acid. *Planta Med* 84:1068-1093
193. **Russel WW** (1899) Aberrant portions of the Müllerian duct found in an ovary. *Johns Hopkins Hospital Bull* 10:8-10
194. **Saberi S, Farhoud AR, Radmehr A** (2009) Calf endometriosis: A case report and review of musculoskeletal involvement. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 38:E175-E178
195. **Salem AM, Mohammaden TF, Ali MA, Mohamed EA, Hasan HF** (2016) Ellagic and ferulic acids alleviate gamma radiation and aluminium chloride-induced oxidative damage. *Life Sci* 160:2-11
196. **Samartzis EP, Imesch P, Fink D** (2012) Pathogenese der Endometriose. *Gynäkologie* 3:6-10
197. **Sampson JA** (1927) Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14:422-469
198. **SAN-U-VIT GmbH** (2022a) Granatapfel Extrakt. URL: <https://www.sanuvit.com/A-Z-Register/Produkte-von-A-Z/Granatapfel-Extrakt-Kapseln.html?listtype=search&searchparam=Ellagsäure>. Abgerufen: 2023-06-11
199. **SAN-U-VIT GmbH** (2022b) Indol-3-Carbinol Kapseln. URL: <https://www.sanuvit.com/A-Z-Register/Indol-3-Carbinol-Kapseln.html>. Abgerufen: 2023-06-11
200. **Sarma D, Iyengar P, Marotta TR, TerBrugge KG, Gentili F, Halliday W** (2004) Cerebellar endometriosis. *AJR Am J Roentgenol* 182:1543-1546
201. **Schmandke H** (2005) Indolderivate aus glucosinolathaltigen Lebensmitteln mit antikanzergener Wirkung. *Ernährungs Umschau* 52:276-278
202. **Scholzen T, Gerdes J** (2000) The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322
203. **Scutiero G, Iannone P, Bernardi G, Bonaccorsi G, Spadaro S, Volta CA, Greco P, Nappi L** (2017) Oxidative stress and endometriosis: A systematic review of the literature. *Oxid Med Cell Longev* 2017:1-7

204. **Shertzer HG, Berger ML, Wilson Tabor M** (1988) Intervention in free radical mediated hepatotoxicity and lipid peroxidation by indole-3-carbinol. *Biochem Pharmacol* 37:333-338
205. **Silveira CG, Finas D, Hunold P, Köster F, Stroschein K, Canny GO, Moldenhauer G, Altevogt P, Rody A, Hornung D** (2013) L1 cell adhesion molecule as a potential therapeutic target in murine models of endometriosis using a monoclonal antibody approach. *PLoS One* 8:1-12
206. **Siomek A** (2012) NF- κ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol* 59:323-331
207. **Słopeń R, Męczekalski B** (2016) Aromatase inhibitors in the treatment of endometriosis Review. *Prz Menopauzalny* 15:43-47
208. **Sokolov DI, Solodovnikova NG, Pavlov OV, Niauri DA, Volkov NN, Sel'kov SA** (2005) Study of cytokine profile and angiogenic potential of peritoneal fluid in patients with external genital endometriosis. *Bull Exp Biol Med* 140:541-544
209. **Somigliana E, Viganò P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P** (1999) Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod* 14:2944-2950
210. **Souli E, Machluf M, Morgenstern A, Sabo E, Yannai S** (2008) Indole-3-carbinol (I3C) exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumors in mice. *Food Chem Toxicol* 46:863-870
211. **Steck T, Felberbaum RE, Küpker W, Brucker C, Finas DF** (eds) (2004) Endometriose: Entstehung, Diagnose, Verlauf und Therapie. *Springer*, Berlin, pp 73-77
212. **Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ** (1984) Immunologic aspects of human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 6:33-36
213. **Stratton P, Winkel C, Premkumar A, Chow C, Wilson J, Hearn-Stokes R, Heo S, Merino M, Nieman LK** (2003) Diagnostic accuracy of laparoscopy, magnetic resonance imaging, and histopathologic examination for the detection of endometriosis. *Fertil Steril* 79:1078-1085
214. **Stratton P, Berkley KJ** (2011) Chronic pelvic pain and endometriosis: Translational evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update* 17:327-346
215. **Suginami H** (1991) A reappraisal of the coelomic metaplasia theory by reviewing endometriosis occurring in unusual sites and instances. *Am J Obstet Gynecol* 165:214-218

216. **Surrey ES, Halme J** (1991) Effect of platelet-derived growth factor on endometrial stromal cell proliferation in vitro: A model for endometriosis? *Fertil Steril* 56:672-679
217. **Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB** (2005) Indole-3-carbinol suppresses NF- κ B and I κ B α kinase activation, causing inhibition of expression of NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. *Blood* 106:641-649
218. **Thomson CA, Ho E, Strom MB** (2016) Chemopreventive properties of 3,30-diindolylmethane in breast cancer: Evidence from experimental and human studies. *Nutr Rev* 74:432-443
219. **Tsai JT, Liu HC, Chen YH** (2010) Suppression of inflammatory mediators by cruciferous vegetable-derived indole-3-carbinol and phenylethyl isothiocyanate in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Mediators Inflamm* 2010:1-5
220. **Tuttles F, Keckstein J, Ulrich U, Possover M, Schweppe KW, Wustlich M, Buchweitz O, Greb R, Kandolf O, Mangold R, Masetti W, Neis K, Rauter G, Reeka N, Richter O, Schindler AE, Sillem M, Terruhn V, Tinneberg HR** (2005) ENZIAN-Score, eine Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose. *Zentralbl Gynakol* 127:275-281
221. **Umesalma S, Sudhandiran G** (2010) Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 107:650-655
222. **Umesalma S, Sudhandiran G** (2011) Ellagic acid prevents rat colon carcinogenesis induced by 1, 2 dimethyl hydrazine through inhibition of AKT-phosphoinositide-3 kinase pathway. *Eur J Pharmacol* 660:249-258
223. **Umesalma S, Nagendrababhu P, Sudhandiran G** (2015) Ellagic acid inhibits proliferation and induced apoptosis via the Akt signaling pathway in HCT-15 colon adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biochem* 399:303-313
224. **Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Dolmans MM, Donnez J** (2002) Potential involvement of hemoglobin and heme in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 77:561-570
225. **Van Langendonckt A, Casanas-Roux F, Eggermont J, Donnez J** (2004) Characterization of iron deposition in endometriotic lesions induced in the nude mouse model. *Hum Reprod* 19:1265-1271

226. **Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA, Van Poppel G** (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* 103:79-129
227. **Vlahos NF, Gregoriou O, Deliveliotou A, Perrea D, Vlachos A, Zhao Y, Lai J, Creatas G** (2010) Effect of pentoxifylline on vascular endothelial growth factor C and flk-1 expression on endometrial implants in the rat endometriosis model. *Fertil Steril* 93:1316-1323
228. **Von Recklinghausen F** (1896) Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: Their origin as remnants of the Wolffian body. *Wien Klin Wochenschr* 8:530
229. **Von Rokitsansky C** (1860) Ueber Uterusdrusen-Neubildung in Uterus- und Ovarial-Sarcomen. *Ztschr KK Gesellsch Ärzte Wien* 37:577-581
230. **Wagener C, Müller O** (eds) (2010) Angiogenese und Lymphangiogenese. Molekulare Onkologie, 3. Auflage, *Thieme*, Stuttgart, pp 367-368
231. **Walter AJ, Hentz JG, Magtibay PM, Cornella JL, Magrina JF** (2001) Endometriosis: Correlation between histologic and visual findings at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 184:1407-1411
232. **Wang CC, Xu H, Man GCW, Zhang T, Chu KO, Chu CY, Cheng JTY, Li G, He YX, Qin L, Lau TS, Kwong J, Chan TH** (2013) Prodrug of green tea epigallocatechin-3-gallate (pro-EGCG) as a potent anti-angiogenesis agent for endometriosis in mice. *Angiogenesis* 16:59-69
233. **Wang D, Chen Q, Liu B, Li Y, Tan Y, Yang B** (2016) Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. *Acta Cir Bras* 31:143-149
234. **Wattenberg LW, Loub WD** (1978) Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by sodium cyanate. *Cancer Res* 38:1410-1413
235. **Waxman DJ** (1988) Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid hormones. Regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. *Biochem Pharmacol* 37:71-84
236. **Weng J-R, Tsai C-H, Kulp SK, Chen C-S** (2008) Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Lett* 262:153-163
237. **Weyerstahl T, Stauber M** (eds) (2007) Endometriose. Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe, 3. Auflage, *Thieme*, Stuttgart pp 310-317

238. **Wieser F, Cohen M, Gaeddert A, Yu J, Burks-Wicks C, Berga SL, Taylor RN** (2007) Evolution of medical treatment for endometriosis: Back to the roots? *Hum Reprod Update* 13:487-499
239. **Williams DE** (2021) Indoles derived from glucobrassicin: Cancer chemoprevention by indole-3-carbinol and 3,3-diindolylmethane. *Front Nutr* 8:1-14
240. **Wirtzfeld LA, Wu G, Bygrave M, Yamasaki Y, Sakai H, Moussa M, Izawa JI, Downey DB, Greenberg NM, Fenster A, Xuan JW, Lacefield JC** (2005) A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model. *Cancer Res* 65:6337-6345
241. **Wu HT, Lin SH, Chen YH** (2005) Inhibition of cell proliferation and in vitro markers of angiogenesis by indole-3-carbinol, a major indole metabolite present in cruciferous vegetables. *J Agric Food Chem* 53:5164-5169
242. **Wymann MP, Pirola L** (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1436:127-150
243. **Xu S, Sun J, Zhang Y, Ji J, Sun X** (2021) Opposite estrogen effects of estrone and 2-hydroxyestrone on MCF-7 sensitivity to the cytotoxic action of cell growth, oxidative stress and inflammation activity. *Ecotoxicol Environ Saf* 209:1-9
244. **Xu Z, Zhao F, Lin F, Chen J, Huang Y** (2012) Lipoxin A4 inhibits the development of endometriosis in mice: The role of anti-inflammation and anti-angiogenesis. *Am J Reprod Immunol* 67:491-497
245. **Zeitoun K, Takayama K, Sasano H, Suzuki T, Moghrabi N, Andersson S, Johns A, Meng L, Putman M, Carr B, Bulun SE** (1998) Deficient 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in endometriosis: Failure to metabolize 17 β -estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4474-4480

9 Danksagung

Diese wissenschaftliche Arbeit basiert auf den Kenntnissen und der Hilfsbereitschaft vieler engagierter Unterstützer. Aus diesem Grund möchte ich folgenden Personen ausdrücklich danken:

- An erster Stelle gilt mein Dank Frau Dr. Jeannette Rudzitis-Auth für die kompetente Betreuung, insbesondere für den geduldigen Umgang mit meinen Fragen.
- Ein großer Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Matthias W. Laschke für die Übernahme der Dissertation als Doktorvater sowie Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas.

Des Weiteren danke ich:

- Janine Becker, Caroline Bickelmann, Sandra Hans und Ruth Nickels für die umfangreiche Unterstützung bei den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen.
- Dr. Claudia Scheuer und Julia Parakenings für die Hilfe bei der Durchführung der Western Blot-Analysen.
- Allen Tierpflegerinnen und Tierpflegern für die Pflege und Versorgung der Mäuse.
- Meiner Familie und meinen Freunden für den emotionalen Rückhalt, die anregenden Gespräche und die Informationsbereitschaft.
- Der Stiftung der deutschen Wirtschaft (sdw), die mein Studium und meine Promotion gefördert hat.

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11 Publikation

Aus dieser Dissertation ist folgende Originalarbeit entstanden:

- Rudzitis-Auth J, **Becker M**, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW (2022) Indol-3-carbinol inhibits the growth of endometriotic lesions by suppression of microvascular network formation. *Nutrients* 14:1-15