

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger

# **Die Regulation der Angiogenese in Endometrioseherden durch den Notch-Signalweg**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2023

vorgelegt von Miriam Dominique Gerstner

geb. am 30.11.1988 in Rastatt

Tag der Promotion: 17.10.2023

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Laschke  
Prof. Dr. E.-F. Solomayer

Meiner Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>2</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Endometriose .....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Definition und Epidemiologie .....	3
3.1.2 Einteilung .....	3
3.1.3 Ätiologie .....	4
3.1.4 Pathologie.....	4
3.1.5 Vaskulogenese und Angiogenese .....	5
3.1.5.1 Parallelen zur Tumorbilogie .....	6
3.1.6 Diagnostik und Stadieneinteilung .....	7
3.1.7 Therapie.....	7
3.1.7.1 Symptomatische Therapie mittels Analgetika .....	8
3.1.7.2 Orale Kontrazeptiva .....	8
3.1.7.3 Gestagene.....	8
3.1.7.4 GnRH-Analoga.....	8
3.1.7.5 Operative Therapie .....	9
<b>3.2 Tiermodelle in der Endometrioseforschung.....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Das Modell der Chorionallantoismembran des Hühnereis .....	10
3.2.2 Primatenmodelle.....	10
3.2.3 Nagemodelle .....	11
<b>3.3 Notch-Signalweg .....</b>	<b>13</b>
3.3.1 Die Funktion des Notch-Signalwegs.....	13
3.3.2 Aufbau des Rezeptors und der Liganden .....	13
3.3.3 Ablauf und Beeinflussung des Notch-Signalwegs.....	14
3.3.4 Vorkommen des Notch-Signalwegs .....	15
<b>3.4 Gamma-Sekretase-Inhibitoren (GSI) und deren Auswirkung auf die Angiogenese.....</b>	<b>16</b>
<b>4. ZIEL DER STUDIE.....</b>	<b>18</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>5.1 Versuchstiere.....</b>	<b>19</b>

---

<b>5.2</b>	<b>Vaginale Zyklusbestimmung</b> .....	<b>19</b>
<b>5.3</b>	<b>Modell</b> .....	<b>20</b>
5.3.1	Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer .....	20
5.3.2	Implantation der Rückenhautkammer.....	21
5.3.3	Isolierung von Endometrium.....	22
5.3.4	Transplantation von Endometrium.....	23
<b>5.4</b>	<b>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</b> .....	<b>24</b>
5.4.1	Mikrozirkulatorische Parameter .....	25
5.4.1.1	<i>Fläche</i> .....	26
5.4.1.2	<i>Funktionelle Kapillardichte</i> .....	26
5.4.1.3	<i>Gefäßdurchmesser</i> .....	27
5.4.1.4	<i>Blutzellgeschwindigkeit</i> .....	27
5.4.1.5	<i>Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss</i> .....	28
5.4.1.6	<i>Anzahl der Gefäßsprossen pro Fläche</i> .....	28
<b>5.5</b>	<b>Histologie</b> .....	<b>29</b>
5.5.1	Konventionelle Histologie .....	29
5.5.2	Immunhistochemie.....	29
<b>5.6</b>	<b>Experimentelles Protokoll</b> .....	<b>30</b>
5.6.1	Versuchsablauf .....	30
5.6.1.1	<i>Versuchsreihe I</i> .....	30
5.6.1.2	<i>Versuchsreihe II</i> .....	31
<b>5.7</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>33</b>
<b>6.1</b>	<b>Versuchsreihe I</b> .....	<b>33</b>
6.1.1	Entwicklung der Transplantate .....	33
6.1.2	Gefäßsprossen .....	33
6.1.3	Mikrovaskuläres Netzwerk.....	34
6.1.4	Mikrohämodynamik.....	36
6.1.5	Histologie .....	36
<b>6.2</b>	<b>Versuchsreihe II</b> .....	<b>38</b>
<b>6.3</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>42</b>

---

<b>7.1</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden .....</b>	<b>42</b>
7.1.1	Diskussion des Modells .....	42
7.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken .....	44
<b>7.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
7.2.1	Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven .....	48
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>49</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>PUBLIKATION.....</b>	<b>66</b>
<b>11.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>67</b>

## 1. Zusammenfassung

Die Endometriose ist eine gutartige, gynäkologische Erkrankung, die 5-10% aller Frauen im reproduktiven Alter betrifft. Sie ist charakterisiert durch das Vorkommen von endometrialen Drüsen und Stroma außerhalb der Gebärmutterhöhle. Die Endometriose geht mit einer hohen Morbidität einher und führt bei den betroffenen Frauen oftmals zu Infertilität.

Nach der Implantationstheorie von Sampson entwickeln sich Endometrioseherde aus versprengten Endometriumfragmenten, die durch retrograde Menstruation in die Peritonealhöhle gelangen. Damit diese dort überleben und einwachsen können, schütten sie verschiedene proangiogene Faktoren aus, welche die Angiogenese, das heißt die Bildung neuer Blutgefäße, im umliegenden Gewebe induzieren.

Eine wichtige Rolle beim Prozess der Angiogenese spielt der Notch-Signalweg. In verschiedenen Tumorstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung des Notch-Signalwegs zu einer übermäßigen Gefäßsprossung mit Ausbildung eines funktionslosen Gefäßnetzwerks führt, sodass es zur Schrumpfung der Tumorherde kommt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung des Notch-Signalwegs für die Angiogenese in Endometrioseherden untersucht. Hierzu wurden Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer von C57BL/6 Mäusen transplantiert. Diese wurden entweder mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor N-[N-(3,5-Difluorophenylacetyl-L-alanyl)-S-phenylglycine-t-butylester (DAPT), einem Hemmer des Notch-Signalwegs, oder Vehikel behandelt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die Vaskularisierung, die Morphologie und die Proliferation der Herde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, Histologie und Immunhistochemie analysiert.

Die Hemmung des Notch-Signalwegs mit DAPT führte im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe innerhalb der ersten Tage zu einer erhöhten Anzahl an Gefäßsprossen in den sich entwickelnden Endometrioseherden. Dies ging sowohl mit einer Vergrößerung der vaskularisierten Fläche als auch mit einer Erhöhung der funktionellen Gefäßdichte an Tag 6 einher. Anders als in Tumorstudien beschrieben, beeinflusste die Behandlung jedoch nicht die Morphologie und Proliferationsaktivität der Endometrioseherde. Die Herde beider Versuchsgruppen wiesen an Tag 14 eine typische Morphologie mit von vaskularisiertem Stroma umgebenen, zystenähnlich erweiterten Drüsen auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Notch-Signalweg an der Regulation der Angiogenese in Endometrioseherden beteiligt ist. Allerdings hat die Hemmung des Notch-Signalwegs keinen Einfluss auf die Ansiedlung der Endometrioseherde. Weiterführende Studien müssen daher klären, inwiefern zukünftig die Beeinflussung der Angiogenese durch Hemmung des Notch-Signalwegs zur Entwicklung neuartiger Behandlungsstrategien bei Endometriose genutzt werden kann.

## 2. Summary

Endometriosis is a benign, gynecological disease affecting 5-10% of all women in reproductive age. It is characterized by the presence of endometrial glands and stroma outside the uterine cavity. Endometriosis is associated with a high morbidity rate and often leads to infertility of the affected women.

According to Sampson's implantation theory, endometriotic lesions evolve from dispersed endometrial fragments, which reach the peritoneal cavity by retrograde menstruation. In order to engraft and to survive, they release different proangiogenic growth factors, which stimulate angiogenesis, i.e. the development of new blood vessels, in the surrounding tissue.

The Notch signaling pathway is crucially involved in the regulation of angiogenesis. Tumor studies have shown that the inhibition of the Notch signaling pathway leads to excessive blood vessel sprouting and to the formation of a non-functional vascular network, resulting in the regression of tumors. Based on this knowledge, the aim of the present study was to investigate the influence of the Notch signaling pathway on the process of angiogenesis in endometriotic lesions. For this purpose endometrial fragments were transplanted into the dorsal skinfold chamber of C57BL/6 mice. They were either treated with the gamma secretase inhibitor N-[N-(3,5-Difluorophenylacetyl-L-alanyl)-S-phenylglycine-t-butylester (DAPT) which is a Notch signaling pathway inhibitor or vehicle. Vascularization, morphology and proliferation of the endometriotic lesions were analyzed over 14 days by intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry.

The inhibition of the Notch signaling pathway with DAPT increased the number of microvascular sprouts in the endometriotic lesions during the first days when compared to the vehicle-treated control group. This was associated with an increased vascularized surface area and functional microvessel density on day 6. In contrast to tumor studies, DAPT treatment did not affect the morphology and the proliferation activity of the endometriotic lesions. On day 14 the lesions of both groups exhibited a typical morphology with vascularized stroma surrounding cyst-like dilated endometrial glands.

These results demonstrate that the Notch signaling pathway is involved in the regulation of angiogenesis in endometriotic lesions. However, inhibition of the Notch signaling pathway does not affect the development of endometriotic lesions. Thus, further studies have to clarify, whether the alteration of angiogenesis by the inhibition of the Notch signaling pathway can be used to develop novel treatment strategies in endometriosis.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Endometriose

##### 3.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Endometriose definiert sich durch das Vorkommen von Endometrioseherden außerhalb der Gebärmutterhöhle, die aus endometrialen Drüsen und Stroma bestehen. Von dieser gutartigen und hormonabhängigen Erkrankung sind ca. 5-10% der Frauen im reproduktionsfähigen Alter betroffen (Viganò et al., 2004; Beinder, 2011; Weyerstahl und Stauber, 2013; Chung und Han, 2022). Mit Beenden des reproduktiven Alters und somit des Menstruationszyklus beim Eintritt in die Menopause kommt es zur Rückbildung der Herde. Typische Symptome der Erkrankung sind Dysmenorrhö, Dyspareunie, chronische Unterbauschmerzen und Infertilität (Nap et al., 2004b; Kalaitzopoulos et al., 2021), wobei das Beschwerdebild nicht notwendigerweise mit der klinischen Ausprägung korreliert (Gao et al., 2006; Weyerstahl und Stauber, 2013). So haben 30-40% der Endometriosepatientinnen keine Beschwerden. Die Diagnose der Endometriose wird am häufigsten als Zufallsbefund bei Sterilitätspatientinnen gestellt. Bei diesen Patientinnen zeigt sich in 40-60% im Rahmen einer Laparoskopie eine Endometriose (Kaufmann et al., 2013). Die Endometriose ist somit eine unterdiagnostizierte Erkrankung (Gao et al., 2006), bei der eine lange Zeitspanne zwischen dem Auftreten von Symptomen und der Diagnosestellung liegen kann (Giudice und Kao, 2004). Außerdem geht diese Erkrankung mit einer hohen Morbidität, einer oft starken Einschränkung der Lebensqualität und hohen sozioökonomischen Kosten einher (Gao et al., 2006).

##### 3.1.2 Einteilung

Die Einteilung der Endometriose erfolgt nach der Lokalisation der Herde in die *Endometriosis genitalis interna* und *externa* sowie in die *Endometriosis extragenitalis* (Weyerstahl und Stauber, 2013). Bei der *Endometriosis genitalis interna* befinden sich die Endometrioseherde im Uterus und den Tuben. Eine Unterform der *Endometriosis genitalis interna* ist die *Adenomyosis uteri*, da sich die Endometrioseherde hierbei innerhalb des Myometriums befinden (Kaufmann et al., 2013; Vannuccini et al., 2022). Sind die Herde außerhalb des Cavum uteri an den Organen des kleinen Beckens, wie unter anderem den Ovarien und den Ligamenta sacrouterina, lokalisiert, spricht man von der *Endometriosis genitalis externa*. Dagegen befinden sich bei der *Endometriosis extragenitalis* die Herde außerhalb des kleinen Beckens, wie zum Beispiel am Darm oder an der Blase. Die häufigsten Lokalisationen von Endometrioseherden sind mit 60% das Ligamentum sacrouterinum und der Bereich des Peritoneums im Douglasraum sowie mit 50% das Ovar. Am Ovar bilden sich mitunter Zysten, die auf Grund ihres dunkelbraunen Inhalts auch den Namen „Schokoladenzysten“ tragen. Ist

der interstitielle Tubenabschnitt befallen, spricht man von einer *Salpingitis isthmica nodosa* (Weyerstahl und Stauber, 2013).

### 3.1.3 Ätiologie

Zur Entstehung der Endometriose gibt es verschiedene Theorien:

Laut der Metaplasietheorie nach Meyer führen wiederholte Irritationen des Zölomepithels zur Umwandlung pluripotenter Zölomepithelzellen in Endometriumgewebe (Weyerstahl und Stauber, 2013). Diese Theorie wird durch das Auftreten von Endometrioseherden bei Frauen mit nur rudimentär angelegtem Uterus und fehlendem Endometrium gestützt (Beinder, 2011).

Die immunologische Theorie geht davon aus, dass Endometriumgewebe wegen eines Immundefekts ektop überleben und wachsen kann (Lebovic et al., 2001; Giudice und Kao, 2004). Normalerweise entfernen Makrophagen der körpereigenen Abwehr die Endometrioseherde, die sich im Douglasraum befinden (Weyerstahl und Stauber, 2013). Aufgrund eines isolierten Immundefekts gegen autologes Endometriumgewebe kommt es im Peritoneum zu einer inadäquaten Immunantwort, sodass Endometriumfragmente außerhalb der Gebärmutterhöhle anwachsen und proliferieren können (Giudice und Kao, 2004; Weyerstahl und Stauber, 2013).

Weitere Theorien besagen, dass es während der Menstruation sowohl zur hämatogenen Streuung von Endometriumzellen über die Venen des Uterus und der Ovarien (Sampson, 1927a) als auch zur lymphogenen Streuung kommen kann (Kaufmann et al., 2013).

Die gängigste Theorie zur Entstehung der Endometriose ist die Implantationstheorie von Sampson, welche postuliert, dass während der Menstruation vitale Zellen des Endometriums retrograd über die Tuben in die Bauchhöhle gelangen und dort unter günstigen Bedingungen anwachsen (Sampson, 1927b). Zwar findet sich bei 90% aller gesunden Frauen eine retrograde Menstruation, jedoch entwickeln nicht alle Frauen eine Endometriose (Halme et al., 1984; Giudice und Kao, 2004; Chung und Han, 2022). Bei Endometriosepatientinnen wird die retrograde Menstruation durch eine bestehende uterine Hyperperistaltik mit Erhöhung des intrauterinen Drucks gefördert. Diese Theorie wird durch verschiedene wissenschaftliche Untersuchungen unterstützt, die belegen, dass sich im Menstruationsblut vitale Endometriumdrüsen und endometriales Stroma befinden (Salamanca und Beltrán, 1995; Beinder, 2011; Weyerstahl und Stauber, 2013).

### 3.1.4 Pathologie

Das makroskopische Erscheinungsbild von Endometrioseherden kann sehr variabel sein. Meist sind die dunkelbraunen, stecknadelkopfgroßen Herde gruppiert angeordnet, leicht erhaben und wachsen polypös oder infiltrierend. Außerdem unterscheiden sich

Endometrioseherde in ihrem Differenzierungsgrad und ihrer Hormonabhängigkeit (Weyerstahl und Stauber, 2013). Anhand des Aussehens der Endometrioseherde kann man die Erkrankung in mehrere Stadien einteilen. Aufgrund des dichten Gefäßnetzwerks in den Herden sind diese zu Beginn rot gefärbt. Im Verlauf vernarben die Herde durch die entzündliche Reaktion der Umgebung zunehmend, sodass die Herde von einem weißlichen Narbengewebe umgeben sind. Da sich die Herde dadurch nicht weiter ausdehnen können, verfärben sie sich im weiteren Verlauf durch Hämosiderineinlagerungen schließlich dunkel bis schwarz (Kaufmann et al., 2013).

70% der Herde besitzen Östrogenrezeptoren, sind somit hormonabhängig und unterliegen den gleichen zyklischen Veränderungen wie das Endometrium in der Gebärmutter. Hierbei führen Gestagene zur sekretorischen Umwandlung der endometrialen Drüsen und Östrogene fördern die Proliferation. Außerdem gibt es Herde mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden des Drüsenepithels ohne hormonabhängige Aktivität. Eine andere Gruppe von Endometrioseherden besitzt ein hoch differenziertes Drüsenepithel ohne endometriumspezifische Differenzierung und somit auch ohne hormonabhängige Veränderungen. Die Zellen dieses Epithels entsprechen dem Epithel der Tuben oder dem Drüsenepithel der Zervix (Weyerstahl und Stauber, 2013).

### **3.1.5 Vaskulogenese und Angiogenese**

Die Endometriose zählt zu den angiogenen Erkrankungen, da sowohl die Vaskulogenese als auch die Angiogenese in der Krankheitsentstehung eine wichtige Rolle spielen (Laschke und Menger, 2007). Beide Vorgänge finden in Endometrioseherden parallel statt (Laschke et al., 2011a). Bei der Vaskulogenese sind endotheliale Vorläuferzellen an der Gefäßneubildung beteiligt (Laschke et al., 2011b), die im Knochenmark oder anderen Geweben mobilisiert werden und über den Blutstrom in Körperareale gelangen, in denen eine Neovaskularisierung stattfindet. Dort werden sie in das Gefäßendothel eingebaut und differenzieren sich zu Gefäßendothelzellen (Laschke et al., 2011a). Laschke et al. (2011a) konnten tierexperimentell zeigen, dass die Vaskulogenese für die Gefäßversorgung von Endometrioseherden essentiell ist, da bei Unterbindung der Rekrutierung zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen die Vaskularisierung der Herde signifikant gehemmt wird. Endotheliale Vorläuferzellen sind unter anderem auch an der Vaskularisierung von Tumoren und von ischämischem Gewebe, wie zum Beispiel bei der Wundheilung, der Heilung von Frakturen oder der Regeneration des Myokards nach Myokardinfarkt, beteiligt (Kopp et al., 2006; Laschke et al., 2011b).

Gleichzeitig zur Vaskulogenese findet in Endometrioseherden Angiogenese statt, bei der sich mittels Gefäßsprossung, Elongation oder Invagination (Risau, 1997; Gambino et al., 2002; Taylor et al., 2009) neue Gefäße aus bereits vorbestehenden Gefäßen ausbilden

(Donnez et al., 1998; Laschke et al., 2011a). Dieser Prozess erfolgt sowohl physiologisch im Endometrium des Uterus während des Menstruationszyklus (Mueller et al., 2000) als auch bei der Entstehung von Endometrioseherden. Hierbei sind die neuen Gefäße für die ektopie Implantation und das Wachstum der Herde wichtig (Shifren et al., 1996).

Ein neuer Gefäßspross entwickelt sich durch Migration und Proliferation von Endothelzellen. Dabei werden verschiedene endotheliale Phänotypen unterschieden: Tip-, Stalk- und Tube-Zelle (Dufraigne et al., 2008). Der jeweilige Phänotyp ist reversibel und abhängig vom Gleichgewicht zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren (Geudens und Gerhardt, 2011; Wacker und Gerhardt, 2011; Tung et al., 2012). Die Tip-Zellen sind nicht-proliferative, nicht-perfundierte, lumenfreie, mikrovaskuläre Endothelzellen mit langen Filopodien (Gerhardt et al., 2003). Diese Filopodien ermöglichen eine aktive Migration in Richtung angiogener Faktoren (Tung et al., 2012) und die Aufnahme verschiedener Wachstumsfaktoren aus der Umgebung (Gerhardt et al., 2003). Jeder Gefäßspross enthält nur eine Tip-Zelle (Dufraigne et al., 2008), die an dessen Spitze sitzt. Direkt hinter der Tip-Zelle befinden sich die Stalk-Zellen, die im Gegensatz dazu keine Filopodien besitzen und proliferativ sind (Gerhardt et al., 2003). Diese Zellen bilden nicht nur das vaskuläre Lumen (Ribatti und Crivellato, 2012), sondern vergrößern auch durch Membransynthese die Oberfläche und die Größe des Gefäßes während des Gefäßwachstums (Geudens und Gerhardt, 2011; Ribatti und Crivellato, 2012). Bei der Bildung des Gefäßlumens werden sie durch die nicht-proliferativen und immobilen Tube-Zellen unterstützt (Dufraigne et al., 2008). Für eine gerichtete Angiogenese ist das richtige Verhältnis zwischen Tip- und Stalk-Zellen essentiell (Roca und Adams, 2007).

### **3.1.5.1 Parallelen zur Tumorbilogie**

Die Endometriose ist zwar eine benigne Erkrankung (Vannuccini et al., 2022), jedoch zeigen Endometrioseherde Ähnlichkeiten mit Tumoren bzw. Tumormetastasen (Edwards et al., 2013). So löst sich bei ihrer Entstehung Endometriumgewebe aus dem Zellverband und bindet adhärent am Peritoneum, indem es invasiv in die extrazelluläre Matrix einwächst. Dort regt es durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren die Gefäßneubildung an. Aufgrund der ektopen Endometriumzellen kommt es im Peritoneum zu einer Entzündungsreaktion, wobei inflammatorische Zytokine, Chemokine sowie verschiedene vasoaktive Substanzen ausgeschüttet werden (Groothuis et al., 2005). Entsprechend konnte auch in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen eine erhöhte Konzentration von proangiogenen Faktoren und Zytokinen festgestellt werden (Oosterlynck et al., 1993; Koninckx et al., 1998). Einer dieser Faktoren ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Thurston et al., 2007), der in der Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose deutlich erhöht ist (McLaren et al., 1996; Shifren et al., 1996; McLaren, 2000).

VEGF wird auch physiologisch von Endometriumzellen produziert und abgegeben (Shifren et al., 1996; Sharkey et al., 2000) und bewirkt die Aktivierung, Proliferation und Migration von Endothelzellen (Groothuis et al., 2005; Hirashima, 2009) sowie eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Mueller et al., 2000). Außerdem stimuliert VEGF die Differenzierung von Endothelzellen zu Tip-Zellen und ist somit wesentlich an den ersten Schritten der Gefäßsprossung im Rahmen der Angiogenese beteiligt (Roca und Adams, 2007). Hierbei interagiert der VEGF-Signalweg mit dem Notch-Signalweg (Roca und Adams, 2007; Hirashima, 2009), der noch ausführlich im weiteren Verlauf dieser Einleitung beschrieben wird.

### **3.1.6 Diagnostik und Stadieneinteilung**

Durch Erheben einer ausführlichen Anamnese kann meist schon die Verdachtsdiagnose „Endometriose“ gestellt werden. Eventuell zeigen sich bereits bei der SpekulumEinstellung inspektorisch kleine, bläuliche Herde an der Vulva, Vagina, Portio sowie im vorderen und hinteren Scheidengewölbe. Im Rahmen der rektovaginalen Untersuchung kann sich bei Befall des Douglasraums ein schmerzhaftes Douglasperitoneum zeigen. Sind die Ligamenta sacrouterina betroffen, tasten sich diese knotig und schmerzhaft. Bei ausgedehnten Verwachsungen der Gebärmutter mit dem Peritoneum des Beckens kann sich eine fixierte Retroflexio uteri darstellen. Sollten Ovarialzysten vorliegen, kann man diese je nach Größe als indolente Tumor tasten (Weyerstahl und Stauber, 2013) und sonografisch als echoarme Zysten darstellen (Coleman et al., 1979). Wenn der Verdacht besteht, dass Nachbarorgane des Uterus mitbefallen sind, sollten weitere Untersuchungen, wie beispielsweise eine Zystoskopie oder eine Koloskopie, durchgeführt werden (Weyerstahl und Stauber, 2013).

Der Goldstandard in der Endometriosedagnostik ist jedoch die Laparoskopie, da in einem Schritt Diagnosestellung und Therapie durchführbar sind (Kaufmann et al., 2013). Des Weiteren ermöglicht sie die intraoperative Stadieneinteilung anhand der Klassifikation der „American Society of Reproductive Medicine“ (rAFS). Folgende Befunde gehen in die Klassifikation ein und werden durch eine Punktzahl bewertet: die Ausdehnung der Endometriose im Peritoneum sowie am Ovar, die Eindringtiefe der Herde, das Vorliegen von Adhäsionen und das Vorhandensein eines Fimbrienverschlusses (Beinder, 2011).

### **3.1.7 Therapie**

Da die Endometriose ein sehr variables Erscheinungsbild aufweist, ist es wichtig, die Behandlung bei jeder Patientin individuell anzupassen. In die Erstellung des Behandlungskonzepts fließen verschiedene Faktoren, wie das Alter der Patientin, ein vorhandener Kinderwunsch, das Ausmaß der Beschwerden, die Nebenwirkungen der Medikamente sowie der individuelle Wunsch der Patientin ein. Zur Behandlung der Endometriose gibt es medikamentöse und chirurgische Therapieansätze (Weyerstahl und

Stauber, 2013). Da die Endometriose östrogenabhängig ist, bezweckt die medikamentöse Therapie die Unterdrückung der endogenen Östrogenproduktion durch die Ovarien (Giudice und Kao, 2004; Vannuccini et al., 2022), sodass es im Rahmen der Hormontherapie zur Atrophie der Endometrioseherde kommt. Das Ziel der operativen Therapie ist die Entfernung aller Endometrioseherde und die Adhäsolyse, um somit die Fertilität zu verbessern und Schmerzfreiheit zu erreichen (Kaufmann et al., 2013). Im Folgenden werden verschiedene medikamentöse Therapien und die operative Therapie näher erläutert.

### **3.1.7.1 Symptomatische Therapie mittels Analgetika**

Wenn die Dysmenorrhö im Vordergrund steht und die Endometriose nur gering ausgeprägt ist, kann man diese mit einer rein symptomatischen Schmerztherapie behandeln. Zur Verfügung stehen hierbei zum Beispiel Prostaglandin-Synthetasehemmer wie Ibuprofen (Weyerstahl und Stauber, 2013; Kalaitzopoulos et al., 2021).

### **3.1.7.2 Orale Kontrazeptiva**

Bei Einnahme von oralen Kontrazeptiva im Langzeitzyklus wird die ovarielle Östrogenproduktion durch eine negative Feedback-Hemmung der hypothalamischen Gonadotropin-Releasing-Hormon(GnRH)-Ausschüttung unterdrückt. Hierdurch wird wiederum die Gonadotropinausschüttung der Hypophyse gehemmt. Es kommt zur Amenorrhö und zur Resorption der Endometrioseherde. Da Ethinylestradiol die Endometriose stimulieren kann, sollten Präparate mit einer niedrigen Ethinylestradioldosierung, wie beispielsweise die Mikropille, bevorzugt werden. Orale Kontrazeptiva werden vor allem postoperativ zur Nachbehandlung der Endometriose eingesetzt (Beinder, 2011; Weyerstahl und Stauber, 2013; Zito et al., 2014).

### **3.1.7.3 Gestagene**

Der Wirkmechanismus der Gestagene entspricht dem der oralen Kontrazeptiva, das heißt, dass auch sie die Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-Achse unterdrücken. Die negative Rückkopplung ist hier jedoch nicht so stark ausgeprägt. Gestagene bewirken eine Schmerzreduktion und es kommt zur Rückbildung der Endometrioseherde. Nebenwirkungen sind unter anderem Durchbruchblutungen, Wassereinlagerungen und psychische Veränderungen (Beinder, 2011; Weyerstahl und Stauber, 2013).

### **3.1.7.4 GnRH-Analoga**

Physiologisch wird GnRH pulsatil vom Hypothalamus ausgeschüttet und entfaltet seine Wirkung an der Hypophyse durch Bindung an GnRH-Rezeptoren. GnRH-Analoga binden dauerhaft an diese Rezeptoren, was zu einer Hemmung der Gonadotropinausschüttung führt. Dadurch kommt es zur sekundären Ovarialinsuffizienz mit Ausbleiben der Follikelreifung im Ovar und Absinken der Östradiolproduktion auf ein Niveau entsprechend

der Postmenopause. Dies bewirkt eine Atrophie des Endometriums und von Endometrioseherden. Der Effekt der GnRH-Analoga ist mit Beendigung der Einnahme reversibel. Durch den Östrogenmangel kommt es zu klimakterischen Nebenwirkungen und zur Begünstigung einer Osteoporose. Um diese Nebenwirkungen zu vermeiden, wird gleichzeitig eine Add-Back-Substitutionstherapie mit einem niedrig dosierten Östrogen-Gestagen-Präparat durchgeführt. Trotzdem sollte der Behandlungszeitraum 6 Monate nicht überschreiten. Verwendung finden die GnRH-Analoga vor allem zur präoperativen Verkleinerung von Endometrioseherden (Beinder, 2011; McLaren et al., 2012; Kaufmann et al., 2013; Weyerstahl und Stauber, 2013; Zito et al., 2014; Vannuccini et al., 2022).

### **3.1.7.5 Operative Therapie**

Die operative Therapie der Endometriose wird heutzutage meist minimalinvasiv im Rahmen einer Laparoskopie durchgeführt. Das Ziel der Operation ist die vollständige Entfernung aller sichtbaren Endometrioseherde sowie die Adhäsiolyse, wodurch gegebenenfalls eine Schmerzfreiheit erreicht werden kann. Bei der Operation sollte allerdings zwischen Frauen mit bestehendem Kinderwunsch und Frauen mit abgeschlossener Familienplanung unterschieden werden, da bei Frauen mit Kinderwunsch der Erhalt und die Verbesserung der Fertilität im Vordergrund stehen. Jedoch liegt die Rezidivrate nach operativer Therapie bei 20-50% (Vercellini et al., 2009; Kaufmann et al., 2013; Weyerstahl und Stauber, 2013).

Zur Optimierung der Therapie werden medikamentöse und chirurgische Maßnahmen kombiniert. Ist die vollständige Entfernung auf Grund einer starken Ausdehnung der Endometriose nicht möglich, kann eine medikamentöse Therapie mit GnRH-Analoga vor einer zweiten Operation zwischengeschaltet werden (Weyerstahl und Stauber, 2013).

Keiner der bisherigen zur Verfügung stehenden Therapieansätze ist potentiell kurativ (Gao et al., 2006). Bei 50% der Patientinnen kommt es nach 5 Jahren zum Rezidiv (Kaufmann et al., 2013). Außerdem treten bei den verfügbaren Medikamenten starke Nebenwirkungen auf (Chung und Han, 2022). Deshalb ist es wichtig, weitere Wirkstoffe zur Behandlung der Endometriose zu entwickeln.

## **3.2 Tiermodelle in der Endometrioseforschung**

In der Endometrioseforschung werden verschiedene Tiermodelle verwendet: Das Modell der Chorionallantoismembran des Hühnereis sowie Primaten- und Nagemodelle. Diese werden im Folgenden ausführlich erklärt.

### **3.2.1 Das Modell der Chorionallantoismembran des Hühnereis**

Die Chorionallantoismembran des Hühnereis entsteht durch Verschmelzung der Allantois- und der Chorionmembran. Diese Doppelmembran weist ein dichtes mikrovaskuläres Netzwerk auf und ist für den Sauerstoffaustausch zwischen Embryo und Außenluft verantwortlich (Ribatti et al., 2001; Kennedy et al., 2021). Nach einer dreitägigen Inkubation des befruchteten Hühnereis bei 37°C und 55% Luftfeuchtigkeit werden mit einer 21G-Nadel 2 ml Eiweiß abgezogen, um die Chorionallantoismembran von der Eierschale zu lösen. Anschließend wird mit Hilfe eines Mikrobohrers eine runde Fläche von ca. 15 mm Durchmesser aus der Eierschale gefräst. Damit das Ei nicht austrocknet, wird das Loch mit Parafilm verschlossen und im Anschluss für die weiteren Untersuchungstage wieder inkubiert (Laschke und Menger, 2007). Da das Immunsystem des Embryos noch nicht vollständig entwickelt ist (Malik et al., 2000; Kennedy et al., 2021), kann man auf die Chorionallantoismembran Xenotransplantate von Säugetieren transplantieren, ohne dass diese abgestoßen werden. Die Transplantation des Gewebes sollte zwischen dem achten und zwölften Tag erfolgen (Laschke und Menger, 2007). Ursprünglich diente dieses Modell im Rahmen der Krebsforschung zur Analyse des invasiven Wachstums von Tumorzellen während der Tumorbildung (Scher et al., 1976). Maas et al. (1999) nutzten dieses Modell erstmals zur Analyse der Vaskularisierung von Endometriumfragmenten als Endometriosemodell. Das Endometriumgewebe wächst durch das Epithel der Chorionmembran und bildet endometrioseähnliche Läsionen aus (Maas et al., 2001; Nap et al., 2003; Nap et al., 2004a). Ein Vorteil des Modells ist, dass man wiederholt die Vaskularisierung der leicht zugänglichen Herde analysieren kann (Grümmer, 2006). Das Modell eignet sich jedoch weniger, um die Rolle des Immunsystems und inflammatorische Prozesse bei der Endometriose zu analysieren (Grümmer, 2006). Zusätzlich ist der Untersuchungszeitraum auf zehn Tage limitiert (Laschke und Menger, 2007).

### **3.2.2 Primatenmodelle**

Primaten können spontan eine Endometriose entwickeln, die der humanen Endometriose sehr ähnlich ist (MacKenzie und Casey, 1975; D'Hooghe et al., 1991; Dick Jr et al., 2003). Dabei zeigte sich, dass die Endometrioserate bei Primaten in Gefangenschaft höher als bei freilebenden Primaten ist. Dies wird auf die niedrigere Schwangerschaftsrate zurückgeführt. Deshalb kommt es zu einer höheren Anzahl von aufeinanderfolgenden Menstruationen und somit zu einer gesteigerten retrograden Menstruation (D'Hooghe et al., 1996). Aus diesem Grund können nach der Implantationstheorie nach Sampson mehr Endometriumfragmente retrograd in die Bauchhöhle gelangen. Da eine Endometriose bei Primaten jedoch erst nach mehreren Jahren spontan entsteht, wurden verschiedene Methoden zur Beschleunigung dieses Vorgangs entwickelt. Sie beinhalten einerseits die Reposition der Zervix (Grümmer, 2006) und andererseits den Verschluss der Zervix (D'Hooghe et al., 1994), sodass in beiden

Fällen das Menstruationsblut ins Abdomen abgeleitet wird. Mittels Injektion gelöster Endometriumfragmente in die Bauchhöhle (D'Hooghe et al., 1995; Fazleabas et al., 2002) oder chirurgischem Annähen von Fragmenten an ektopen Lokalisationen (Yang et al., 2000) kann ebenfalls eine Endometriose künstlich induziert werden. Primatenmodelle sind als Endometriosemodell gut geeignet, da eine starke Ähnlichkeit zu der humanen Beckenanatomie, zum humanen Reproduktionszyklus und zur humanen Immunologie besteht. Diese Modelle sind jedoch sehr kostenintensiv und aus ethischen Gründen schwierig umsetzbar (Laschke und Menger, 2007).

### **3.2.3 Nagermodelle**

Nagetiere können spontan keine Endometriose ausbilden, da sie das Endometrium nicht abstoßen. Deshalb ist es notwendig, eine Endometriose künstlich mittels Transplantation von Endometriumgewebe herbeizuführen (Grümmer, 2006). Bei den Nagermodellen kann man heterologe von homologen Modellen unterscheiden. Bei den heterologen Modellen wird humanes Endometriumgewebe in immundefiziente Mäuse transplantiert (Tirado-González et al., 2010). Dazu zählen unter anderem Mäuse mit Severe Combined Immunodeficiency (SCID) (Aoki et al., 1994; Kaufmann et al., 1995; Awwad et al., 1999) und Nacktmäuse (Bruner et al., 1997; Nisolle et al., 2000; Hull et al., 2005). Das homologe Modell zeichnet sich durch die Transplantation von Endometrium in ein immunkompetentes Tier aus. Dabei wird das Gewebe zwischen zwei Individuen derselben Spezies transplantiert (Tirado-González et al., 2010). Die Transplantation erfolgt in den Nagermodellen entweder autolog (Cummings und Metcalf, 1995; Fainaru et al., 2008) oder syngen (Somigliana et al., 1999; Hirata et al., 2005; Becker et al., 2006). Autolog bedeutet, dass Endometriumgewebe von einem Tier isoliert und dieses demselben Tier in die Bauchhöhle zurück transplantiert wird (Fainaru et al., 2008). Im Gegensatz dazu erfolgt bei der syngen Transplantation der Transfer von Spendertiergewebe in ein genetisch identisches Empfängertier (Somigliana et al., 1999).

Je nach Lokalisation der Transplantate kann man zwischen intra- und extraperitonealen Modellen differenzieren:

#### 1) Intraperitoneale Modelle

Bei den intraperitonealen Modellen werden die Endometriumfragmente an das Peritoneum der Bauchwand angenäht (Becker et al., 2006; Olivares et al., 2011) oder frei in die Bauchhöhle injiziert (Somigliana et al., 1999; Hirata et al., 2005; Fainaru et al., 2008). Die Herde sind hierbei nur schwer auffindbar. Durch Verwendung von Green Fluorescent Protein (GFP)-positivem Gewebe aus transgenen Spendertieren kann man die Transplantate markieren (Hirata et al., 2005; Dèfrere et al., 2006). Da die Herde direkt nur mittels

wiederholter Laparotomien zugänglich sind, wurden verschiedene nicht-invasive Techniken für ihre Analyse entwickelt. Hierzu zählt die Biolumineszenz. Hierbei wird aus transgenen Mäusen Endometrium, welches Luziferase exprimiert, in die Bauchhöhle von Wildtyp-Mäusen transplantiert. Anschließend kann das Gewebe mittels Injektion von Luziferin sichtbar gemacht werden (Becker et al., 2006). Eine weitere Methode der nicht-invasiven Analyse ist die hochauflösende Ultraschalltechnik (Laschke et al., 2010).

### 2) Extraperitoneale Modelle

Ein Beispiel für ein extraperitoneales Modell ist die Rückenhautkammer, die sowohl in Mäusen (Cardon et al., 1970; Lehr et al., 1993) als auch Ratten (Papenfuss et al., 1979) und Hamstern (Endrich et al., 1980) implantiert werden kann. Hierbei wird nach Rasur und Depilation des Rückens des narkotisierten Tiers die aufgespannte Rückenhaut zwischen zwei Titanrahmen fixiert. Im Anschluss wird eine Haut- und Muskelschicht im Durchmesser von ca. 15 mm auf Höhe eines kreisrunden Beobachtungsfensters entfernt, sodass die übrige Schicht aus quergestreifter Muskulatur, subkutanem Gewebe und Haut bestehen bleibt. Das Beobachtungsfenster wird anschließend mit einem herausnehmbaren Deckglas luftdicht verschlossen. Nach der Präparation kann sich das Tier von der Narkose und der Operation erholen, bevor nach 48 Stunden Endometriumgewebe in die Kammer transplantiert wird (Laschke und Menger, 2007). Bei der Präparation des Endometriumgewebes ist zu beachten, dass das luminale Epithel des Endometriums eine physikalische und immunologische Barriere darstellt (Ochiel et al., 2008; Feng et al., 2014). Feng et al. (2014) zeigten, dass ein intaktes lunales Epithel die Vaskularisierung, das Wachstum und die Morphologie implantierter Endometriumfragmente in der Rückenhautkammer beeinflusst. Endometriumfragmente, die das luminale Epithel enthalten, zeigen ein polypöses, vermindertes Wachstum sowie einen niedrigeren Vaskularisierungsgrad. Im Gegensatz dazu weisen Fragmente ohne lunales Epithel eine stärkere und früher beginnende Vaskularisierung und viele Gefäßverbindungen zum umgebenden Gewebe auf. Außerdem bilden diese Fragmente auch endometrioseähnliche Herde aus (Feng et al., 2014).

Des Weiteren können Endometriumfragmente auch subkutan implantiert werden. Dazu erfolgt die Inzision der Haut an der lateralen Bauchwand und die Endometriumfragmente werden subkutan zwischen Haut- und Muskelschicht transplantiert. Anschließend wird die Inzision wieder mit einer Hautnaht verschlossen (Aoki et al., 1994; Xu et al., 2009; Söhngen et al., 2014).

Nagermodelle wurden schon bei vielen Studien zur Endometriose verwendet (Bruner et al., 1997; Somigliana et al., 1999; Olivares et al., 2011). Obwohl Nager keine Endometriose

entwickeln, konnte in vielen Modellen gezeigt werden, dass sich bei der Implantation von Endometrium an ektopen Lokalisationen endometrioseähnliche Herde ausbilden (Story und Kennedy, 2004). Insbesondere das Modell der Rückenhautkammer ermöglicht die detaillierte Analyse der Gefäßentwicklung in ektopem Endometriumgewebe und bietet somit die Möglichkeit, die Wirkung von Inhibitoren der Angiogenese auf Endometrioseherde zu analysieren (Laschke und Menger, 2007). Beispiele für solche Inhibitoren sind Rapamycin (Laschke et al., 2006a), Combretastatin-A4-Phosphat (Feng et al., 2013) und Telmisartan (Nenicu et al., 2014). Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch das Modell der Rückenhautkammer gewählt.

### **3.3 Notch-Signalweg**

#### **3.3.1 Die Funktion des Notch-Signalwegs**

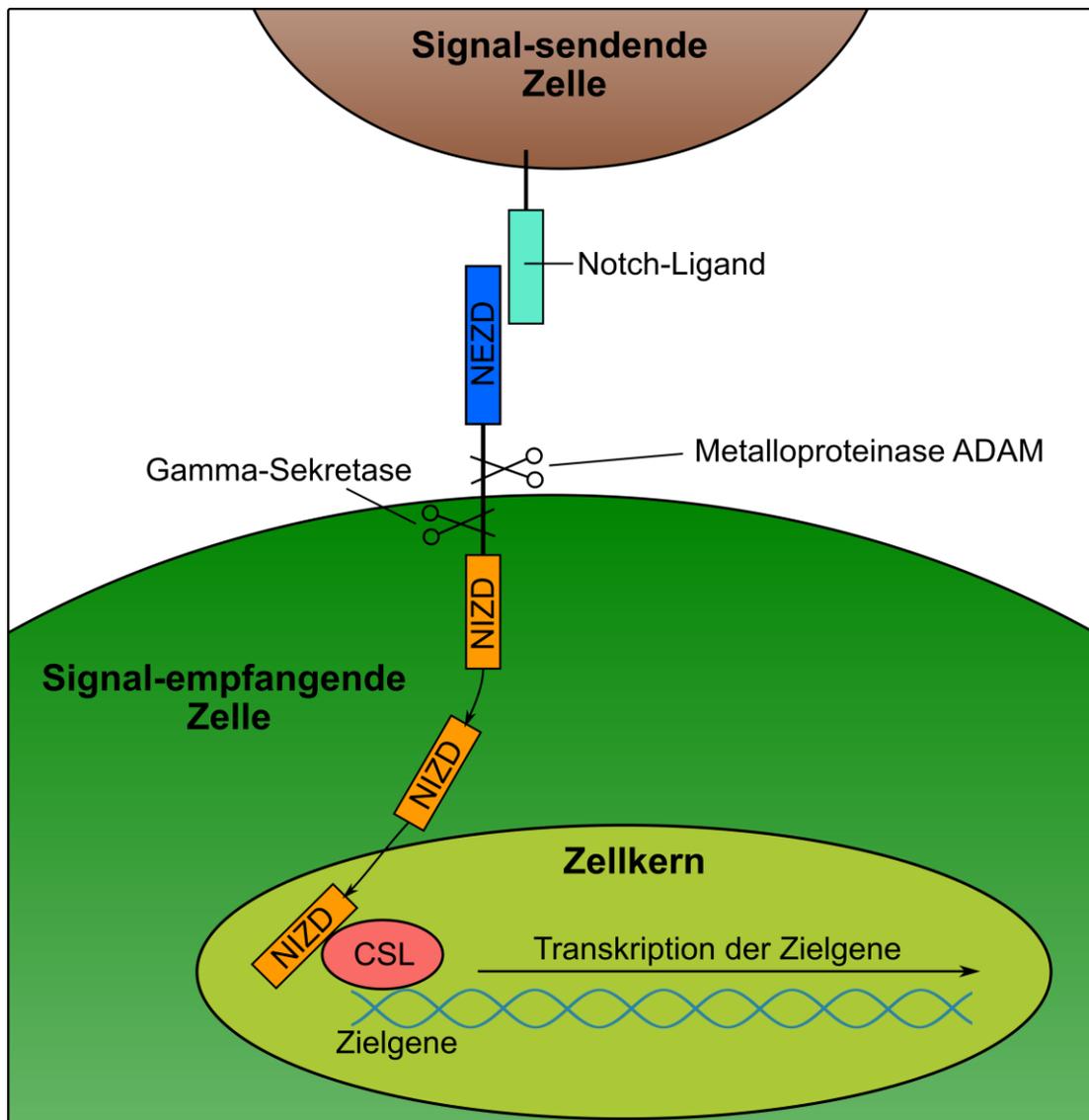
Der Notch-Signalweg ist an der Regulation der Zellen in verschiedenen Geweben, wie Epithel-, Nerven- und Muskelzellen, sowie an der Regulation von Blutzellen beteiligt (Alva und Iruela-Arispe, 2004; Zhou et al., 2022) und beeinflusst hier die Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Miele und Osborne, 1999; Roca und Adams, 2007). Weiterhin steuert er das Gefäßwachstum im Rahmen der Angiogenese, die Proliferation von Endothelzellen, die Differenzierung zu Arterien und Venen (Roca und Adams, 2007; Del Gaudio et al., 2022) und den Umbau neu gebildeter Gefäße in reife Gefäßnetzwerke (Alva und Iruela-Arispe, 2004).

#### **3.3.2 Aufbau des Rezeptors und der Liganden**

Bei Notch handelt es sich um ein Transmembranprotein (Roca und Adams, 2007; Del Gaudio et al., 2022). In Säugetieren gibt es die Notch-Rezeptoren 1-4, die mit folgenden 5 Liganden interagieren: Delta-like (Dll) 1, 3 und 4 sowie Jagged (JAG) 1 und 2 (Alva und Iruela-Arispe, 2004). Die meisten Zellen exprimieren sowohl die Rezeptoren als auch die Liganden (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Die Signalweiterleitung erfolgt mittels Zell-Zell-Kontakt (Dufraigne et al., 2008; D'Assoro et al., 2022) zwischen zwei extrazellulären Domänen (Artavanis-Tsakonas et al., 1999), die essentiell für die Ligandenbindung sind. Die extrazelluläre Domäne besteht sowohl bei den Rezeptoren als auch bei den Liganden aus einer Epithelial Growth Factor (EGF)-Repeat-Komponente (Roca und Adams, 2007; D'Assoro et al., 2022). Die intrazelluläre Domäne besteht aus einem Ankyrinrepeat, einem glutaminreichen Teil und einem C-Terminal (Roca und Adams, 2007).

### 3.3.3 Ablauf und Beeinflussung des Notch-Signalwegs

Nach Bindung eines Notch-Liganden an den Notch-Rezeptor durch Zell-Zell-Kontakt (Dufraine et al., 2008; D'Assoro et al., 2022) erfolgt eine zweimalige proteolytische Spaltung des Rezeptors (Weinmaster, 2000; Harry und Ormiston, 2021) (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs. Die Signal-sende Zelle bindet mit ihrem Notch-Liganden an den NEZD der Signal-empfangenden Zelle. Der NEZD wird extrazellulär durch die Metalloproteinase ADAM und intrazellulär durch eine Gamma-Sekretase vom NIZD abgespalten, sodass der NIZD in den Zellkern diffundieren kann. Dort bindet der NIZD an den Transkriptionsfaktor CSL, wodurch die Transkription der Zielgene induziert wird.

Die Abspaltung der extrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (NEZD) erfolgt durch eine Metalloproteinase der ADAM/TACE/kuzbanian-Familie (Roca und Adams, 2007). Die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NIZD) wird mittels einer Gamma-Sekretase von der Zellmembran getrennt (Alva und Iruela-Arispe, 2004). Anschließend diffundiert die NIZD

in den Zellkern und agiert dort durch Bindung an C-promotor-binding factor / recombination signal-sequence binding protein  $J_K$  / Suppressor-of-Hairless / Lag1 (CSL) (Kopan und Ilagan, 2004) als Transkriptionsaktivator (Kopan und Ilagan, 2009). Bei CSL handelt es sich um ein DNA-Bindungsprotein, das ohne die Bindung der NIZD die Transkription hemmt (Le Borgne et al., 2005; Talora et al., 2008; Del Gaudio et al., 2022). Durch die Bindung der NIZD an CSL wird die Transkription aktiviert, sodass verschiedene Notch-Zielgene abgeschrieben werden (Selkoe und Kopan, 2003; Olsauskas-Kuprys et al., 2013).

Sowohl die Notch-Rezeptoren als auch die -Liganden können auf verschiedene Weise durch posttranslationale Modifikation beeinflusst werden (Roca und Adams, 2007). Die Glykolyse der EGF-Repeat-Komponente des Rezeptors durch das Enzym Fringe kann eine Hemmung sowie eine abgeschwächte Aktivierung des Rezeptors induzieren (Panin et al., 1997; Brückner et al., 2000; Moloney et al., 2000) und führt so zu einer antagonistischen Wirkung zwischen Dll- und JAG-Liganden. Nach der Modifizierung durch Fringe bewirkt die Bindung eines Dll-Liganden ein verstärktes Notch-Signal, wohingegen die Bindung eines JAG-Liganden ein verringertes Notch-Signal hervorruft (D'Souza et al., 2008; Benedito et al., 2009). Auch bei den Liganden kann eine posttranslationale Modifikation durch Proteolyse, Endozytose (D'Souza et al., 2008), Glykolyse (Bray, 2006) oder Ubiquitinierung (Le Borgne et al., 2005; Zhou et al., 2022) stattfinden. Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung des Notch-Signalwegs liegt in der unterschiedlichen Bindung zwischen Rezeptor und Liganden. Entweder bindet der Ligand an einen Rezeptor der eigenen Zelle und bewirkt so eine Hemmung der Zelle oder der Ligand bindet an den Rezeptor der Nachbarzelle und ruft die Aktivierung der Zelle hervor (Kume, 2009).

### **3.3.4 Vorkommen des Notch-Signalwegs**

Die Notch-Rezeptoren und -Liganden werden von unterschiedlichen Geweben und Zellen exprimiert. Der Notch1-Rezeptor kommt vor allem im Herzen und in vaskulären Endothelzellen vor (Krebs et al., 2000; Kume, 2009). Im Gegensatz dazu wird der Notch3-Rezeptor lediglich von Gefäßmuskelzellen (Joutel et al., 1996) und der Notch4-Rezeptor ausschließlich von vaskulären Endothelzellen (Kume, 2009) exprimiert. Auch die Liganden JAG 1, 2 und Dll 1, 4 werden von vaskulären Endothelzellen gebildet (Krebs et al., 2000; Villa et al., 2001; Kume, 2009). Bei Dll1 handelt es sich um einen Regulator der postnatalen Angiogenese (Limbourg et al., 2007), der bei Ischämie verstärkt exprimiert wird (Roca und Adams, 2007). Zusammen mit Dll4 ist er für die Spezialisierung der Gefäße und für die normale Gefäßentwicklung essentiell (Noguera-Troise et al., 2006; Leslie et al., 2007; Kume, 2009). Der antagonistische Gegenspieler zu Dll4 ist JAG1 (Benedito et al., 2009), der wichtig für die Differenzierung von glatten

Gefäßmuskelzellen ist (Kume, 2009). Eine Expression von Notch findet sich somit vor allem bei Arterien und Kapillaren (Villa et al., 2001). Hier kontrolliert Notch das angiogene Wachstum des Gefäßnetzwerks (Roca und Adams, 2007).

### **3.4 Gamma-Sekretase-Inhibitoren (GSI) und deren Auswirkung auf die Angiogenese**

Im Notch-Signalweg ist die Gamma-Sekretase für die intrazelluläre Abspaltung der NIZD von der Zellmembran zuständig (Alva und Iruela-Arispe, 2004). Es handelt sich um ein Transmembranprotein, das aus einer katalytischen Komponente, dem Presenilin 1 oder 2, und den drei zusätzlichen Cofaktoren Nicastrin, Pen2 und Aph1 besteht (Zhou et al., 2022).

GSI verhindern die Aktivierung des Notch-Signalwegs, indem sie die proteolytische Abspaltung der NIZD von der Zellmembran unterbinden (Shih und Wang, 2007). Es kommt nicht zur Transkription der Notch-Zielgene, da CSL nicht aktiviert wird und weiterhin als Transkriptionsrepressor fungiert (Strooper, B et al., 1999). Die meisten GSI hemmen das Enzym kompetitiv (Rizzo et al., 2008).

Da es sich bei der Gamma-Sekretase um eine nichtspezifische Protease handelt, spaltet sie neben Notch auch viele weitere Transmembranproteine (Kolb et al., 2012), wie ErbB4 oder CD44 (Shih und Wang, 2007). Des Weiteren kommt es bei Einsatz von GSI zur Dysfunktion verschiedener Organe, da Notch an physiologischen Prozessen beteiligt ist (Shih und Wang, 2007). Beim Einsatz von GSI zeigten sich bei Nagetieren Veränderungen im Gastrointestinaltrakt, dem Thymus und der Milz (Wong et al., 2004; Barten et al., 2006). Beim Menschen steht vor allem die Zytotoxizität im Gastrointestinaltrakt im Vordergrund. Hierbei kommt es durch eine Becherzellmetaplasie zu einer dosislimitierenden, sekretorischen Diarrhö (Wong et al., 2004; Del Gaudio et al., 2022). Die Stammzellen der Krypten behalten nicht ihren undifferenzierten Status bei, sondern differenzieren sich übermäßig in Becherzellen (Es et al., 2005). An Mäusen konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Gabe von Glukokortikoiden die Becherzellmetaplasie reduziert und somit die gastrointestinalen Nebenwirkungen mindert (Wei et al., 2010; Samon et al., 2012).

Ursprünglich wurden GSI zur Behandlung der Alzheimerdemenz entwickelt (Zhou et al., 2022), da die Gamma-Sekretase an der Produktion der A $\beta$ -Peptide aus dem Amyloidvorläuferprotein mitwirkt (Selkoe und Kopan, 2003). Da der Notch-Signalweg an der Tumorgenese beteiligt ist, wurden einige GSI jedoch auch bezüglich ihrer Wirkung auf Tumoren getestet (Shih und Wang, 2007). Hierbei zeigte sich, dass GSI die Vaskularisierung und das Wachstum von Tumoren hemmen (Luistro et al., 2009). Interessanterweise bewirkt

die Gabe von GSI dabei zwar eine Erhöhung der Gefäßdichte jedoch mit Ausbildung eines nichtfunktionellen Gefäßnetzwerks. Dies resultiert in einer Minderperfusion der Tumoren, sodass es durch Hypoxie zur Hemmung des Tumorwachstums kommt (Vartanian et al., 2013; Zou et al., 2013). Der am häufigsten im Labor benutzte GSI ist der Wirkstoff N-[N-(3,5-Difluorophenylacetyl-L-alanyl]-S-phenylglycine-t-butylester (DAPT) (Olsauskas-Kuprys et al., 2013). In verschiedenen Tumorstudien hemmte DAPT das Tumorwachstum durch die Ausbildung eines nichtfunktionellen Gefäßnetzwerks (Hallahan et al., 2004; Paris et al., 2005; Sjölund et al., 2008). Die Hemmung des Tumorwachstums durch DAPT ist somit ein vielversprechender Ansatz für Tumorthapien und könnte ebenfalls eine therapeutische Möglichkeit zur Behandlung der Endometriose sein. Hier wäre interessant zu untersuchen, welche Wirkung DAPT auf die Angiogenese in Endometrioseherden hat und ob es ebenfalls zu einer Hemmung des Wachstums der Herde kommt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von DAPT auf Endometrioseherde im Modell der Rückenhautkammer analysiert.

#### **4. Ziel der Studie**

Bisher gibt es noch keine kausale Therapie zur Behandlung der Endometriose. Bei der Entwicklung von Endometrioseherden spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle. An der Angiogenese ist der Notch-Signalweg wesentlich beteiligt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Hypothesen geprüft:

- 1) Der Notch-Signalweg ist auch an der Regulation der Angiogenese in Endometrioseherden beteiligt, sodass die Hemmung des Notch-Signalwegs zu einer vermehrten Differenzierung von Tip-Zellen und damit zu einer gesteigerten Ausbildung von Gefäßsprossen in Endometrioseherden führt.
- 2) Die Hemmung des Notch-Signalwegs bewirkt eine schnellere Vaskularisierung von Endometrioseherden.
- 3) Im Verlauf bewirkt die Hemmung des Notch-Signalwegs die Ausbildung eines nicht funktionellen Gefäßnetzwerks in Endometrioseherden, was deren Durchblutung verschlechtert.
- 4) Aufgrund der schlechteren Durchblutung der Endometrioseherde wird durch die Hemmung des Notch-Signalwegs das Wachstum der Endometrioseherde gehemmt.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

Als Empfängertiere für die Implantation der Rückenhautkammer wurden in allen Versuchen weibliche, geschlechtsreife C57BL/6 Mäuse in einem Alter von 12-16 Wochen verwendet. Als Spendertiere für die Entnahme von Endometrium wurden sowohl weibliche, geschlechtsreife C57BL/6 Mäuse als auch weibliche, geschlechtsreife C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Mäuse in einem Alter von 12-16 Wochen benutzt. Da C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)1Osb/J Mäuse in allen Zellen GFP exprimieren, konnte so in den Transplantaten zwischen Spender- und Empfängergewebe unterschieden werden. Alle Mäuse hatten ein Gewicht von 22-25 g und wurden in einem klimatisierten Raum mit 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus gehalten. In ihren Einzelkäfigen hatten die Tiere zu jeder Zeit freien Zugang zu Trinkwasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland). Sämtliche Experimente wurden am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) durchgeführt und waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt.

### 5.2 Vaginale Zyklusbestimmung

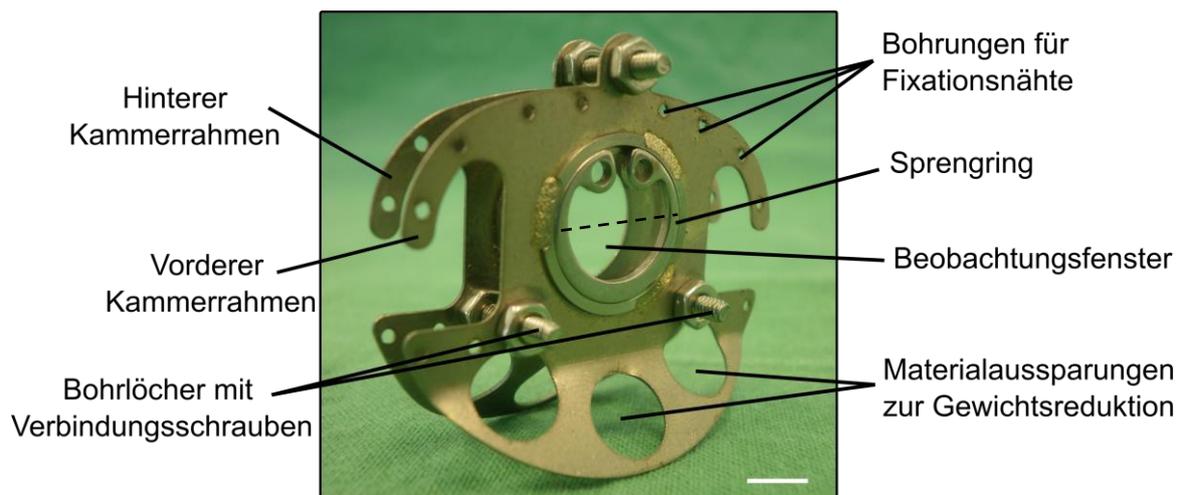
Mäuse haben einen kurzen reproduktiven Zyklus, den Östruszyklus, mit einer Dauer von 4 bis 6 Tagen (Dalal et al., 2001). Um die einzelnen Zyklusstadien von Mäusen zu bestimmen, ist die Zytologie einer Vaginallavage geeignet. Hierfür wurden zuerst 15 µl 0,9%-iger Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) dreimal vorsichtig in die Vagina der wachen Tiere pipettiert. Die gewonnene Vaginallavage wurde anschließend auf einen Objektträger gegeben und unter einem Lichtmikroskop (CH-2; Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 10-facher Vergrößerung untersucht. Die vier aufeinanderfolgenden Stadien des Östruszyklus konnten dabei anhand der Verteilung verschiedener Zelltypen des Vaginalepithels, den Intermediär- und Superfizialzellen sowie den Leukozyten unterschieden werden. Die vier Stadien sind: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus (Dalal et al., 2001; Caligioni, 2009). Im Proöstrus, dem präovulatorischen Stadium, liegen vor allem in Gruppen angeordnete Intermediärzellen und kaum Superfizialzellen oder Leukozyten vor. Mit Übergang in das Östrusstadium treten vor allem polymorphe, kernlose Superfizialzellen auf, die sich zu Schollen zusammenlagern. Dieses Stadium stellt den Übergang von der aktiven zur inaktiven postovulatorischen Phase dar. Der Metöstros kennzeichnet sich durch ein Mischbild verschiedener Zelltypen. Hier wandern zusätzlich zu den Schollen der Superfizialzellen Leukozyten ein und ergeben so ein Mischbild. Das letzte Stadium, der Diöstrus, ist durch das fast ausschließliche Vorhandensein von Leukozyten charakterisiert.

Um Unterschiede zwischen den Versuchstieren aufgrund verschiedener Zyklusstadien zu vermeiden, wurden zum Zeitpunkt der Kammerimplantation ausschließlich im Diöstrus befindliche Tiere verwendet. Die Spendertiere der Endometriumfragmente befanden sich alle im Östrus.

## 5.3 Modell

### 5.3.1 Mikrozirkulationsmodell Rückenhautkammer

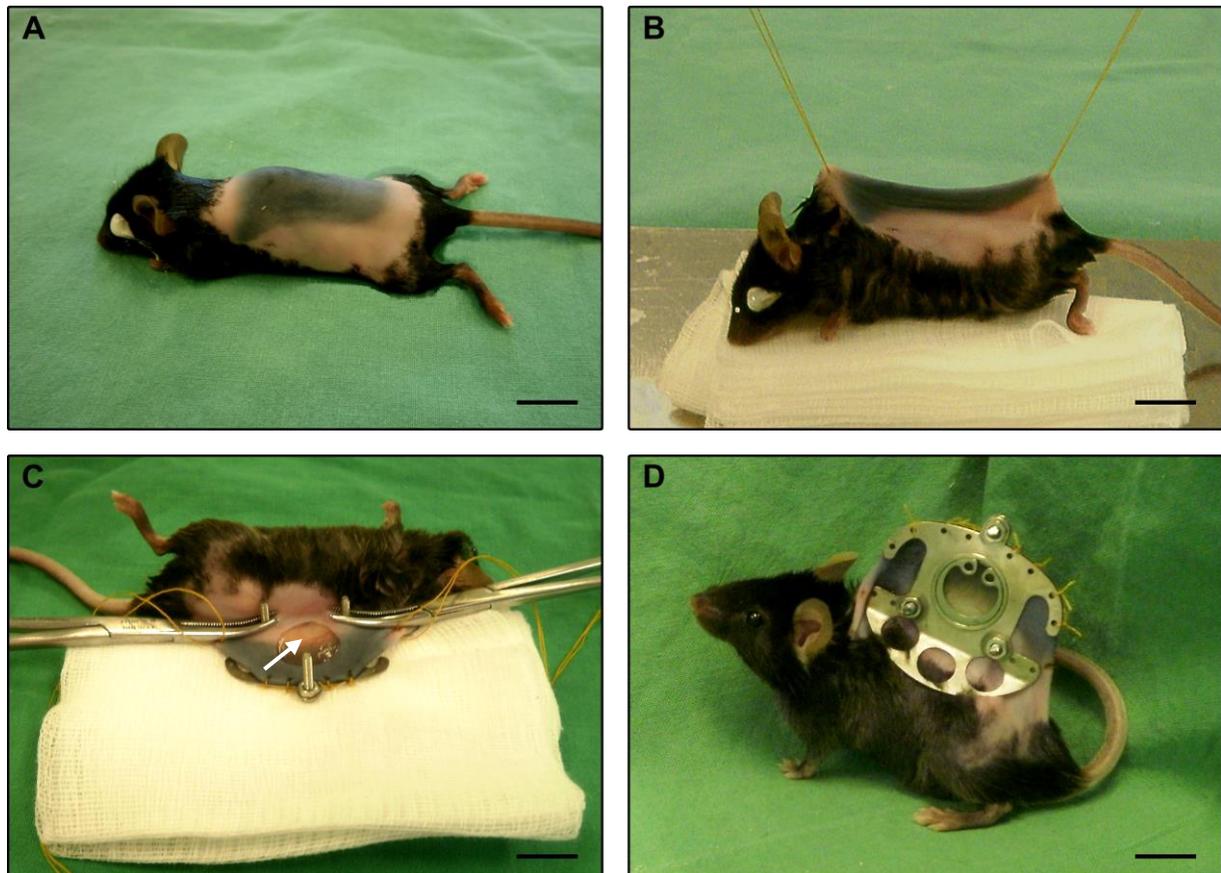
Zur Untersuchung der Wirkung von DAPT auf die Angiogenese in Endometrioseherden wurde das Modell der Rückenhautkammer der Maus verwendet (Abbildung 2). Dieses Modell wurde erstmals 1980 von Endrich et al. am Hamster beschrieben (Endrich et al., 1980) und wird neben Hamstern (Menger et al., 2002) auch an Ratten (Papenfuss et al., 1979) und Mäusen (Cardon et al., 1970; Lehr et al., 1993) angewandt. Die Rückenhautkammer enthält quergestreifte Skelettmuskulatur, subkutanes Gewebe sowie Haut und ermöglicht, über einen Zeitraum von 2-3 Wochen verschiedene mikrozirkulatorische Parameter am wachen oder narkotisierten Versuchstier zu analysieren. Der Prozess der Angiogenese wurde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie sowohl in der freipräparierten Rückenhautmuskulatur als auch in den Gewebetransplantaten, die sich in der Kammer befanden, untersucht. Da die mikroskopischen Bilder auf DVD aufgenommen wurden, konnten diese im Anschluss mittels eines speziellen Bildverarbeitungssystems quantitativ off-line ausgewertet werden.



**Abbildung 2:** Vorderansicht der Rückenhautkammer, die aus zwei symmetrischen Titanrahmen besteht. Diese sind durch 3 Schrauben miteinander verbunden. Im Beobachtungsfenster mit einer Größe von 11 mm Durchmesser (gestrichelte Linie) befindet sich ein Deckglas, das mittels eines Sprengrings fixiert ist. Maßstab = 3,9 mm.

### 5.3.2 Implantation der Rückenhautkammer

Für die Implantation der Rückenhautkammer (Irola Industriekomponenten GmbH & Co. KG, Schonach, Deutschland) (Abbildung 3) wurde das Versuchstier mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin®; Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun®; Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Um die geöffneten Augen der narkotisierten Versuchstiere vor dem Austrocknen zu schützen, wurde eine fettende Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer) aufgetragen. Anschließend erfolgte zum Entfernen der Rückenhaare die elektrische Rasur (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und die chemische Depilation (Plica med Creme; Asid Bonz, Böblingen, Deutschland) der Rückenpartie (Abbildung 3A). Nun wurde die enthaarte Rückenhaut mit lauwarmem Wasser gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert.



**Abbildung 3:** Enthaarte Maus zur Präparation der Rückenhautkammer (A). Aufspannen der Rückenhaut zur Darstellung der Hautgefäße (B). Maus mit hinterem Kammerrahmen bei der Präparation des zirkulären Ausschnitts mit Entfernung der Oberhautschichten (Pfeil) (C). Wache Maus mit implantierter Rückenhautkammer (D). Maßstab: A, B, C = 1,5 cm, D = 1 cm.

In Bauchlage wurde die Rückenhaut durch das Anbringen zweier Haltefäden aufgespannt (Abbildung 3B). Mittels Diaphonoskopie konnten im Anschluss die Hauptgefäße der

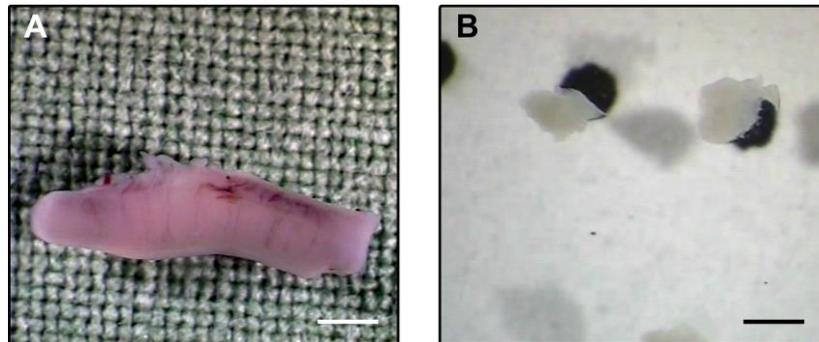
Rückenhaut deckungsgleich übereinander gebracht und der rückseitige Rahmen der aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen bestehenden Rückenhautkammer an seinem oberen Rand mit vier Seidefäden an der Hautfalte fixiert werden. Nach Präparation zweier kleiner Inzisionen an der Basis der Hautfalte konnten durch diese die beiden basalen Befestigungsschrauben des hinteren Rahmens auf die Vorderseite der Kammer geführt werden. Dabei wurde darauf geachtet, die Hauptgefäße nicht zu verletzen. Durch zwei Gefäßklemmen erfolgte die Fixierung der beiden Schrauben. Die Maus wurde nach Entfernen der beiden Haltefäden in Seitenlage gebracht. Unter einem Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) konnte nun auf Höhe des Sichtfensters in einem Durchmesser von ca. 15 mm die vorderseitige Hautschicht und deren Subkutis, die quergestreifte Unterhautmuskulatur sowie die beiden Musculi retractori entfernt werden (Abbildung 3C). Dieser Ausschnitt überschritt die eigentliche Größe des Beobachtungsfensters (11 mm), um eine Kompression des Gewebes und der Gefäße nach Anbringen des vorderseitigen Rahmens zu vermeiden. Nach mehrmaligem Spülen der verbliebenen Gewebeschichten mit Haut, Subkutis und quergestreifter Hautmuskulatur mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung konnte der Rahmen der Vorderseite über die beiden Verbindungsschrauben geschoben und mit drei Muttern befestigt werden. Die Vorderseite des Rahmens enthielt ein Beobachtungsfenster, auf das ein rundes Deckglas gelegt wurde. Das Deckglas legte sich mittels Adhäsion direkt an den quergestreiften Hautmuskel an. Die Fixierung des Deckglases im Kammerrahmen erfolgte mit einem entfernbarren Sprengring, wodurch im Verlauf des Versuchs die Gewebepräparation jederzeit zugänglich war. Zum Schluss wurden die zwei Rahmen durch vier weitere Nähte mit Seidefäden durch die Bohrungen für Fixationsnähte am Oberrand der Rückenhautkammer am Rücken der Maus zusätzlich befestigt (Abbildung 3D). Im Anschluss an die Kammerpräparation konnten sich die Versuchstiere für 48 Stunden von der Narkose und der Operation erholen, sodass sie sich zum Zeitpunkt der Endometriumtransplantation wie die Spendertiere ebenfalls im Östrus befanden.

### **5.3.3 Isolierung von Endometrium**

Zur Gewinnung von Endometriumgewebe (Abbildung 4) wurden beide Uterushörner von C57BL/6- bzw. C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Spender-Mäusen isoliert. Die Spendermäuse wurden hierfür mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin®; Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun®; Bayer) narkotisiert. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops (M651; Leica Microsystems) konnten die beiden Uterushörner über eine mediane Laparotomie dargestellt und am distalen Ende abgesetzt werden. Die Spendermäuse wurden anschließend mit einer Überdosis Narkose eingeschläfert.

Die explantierten Uterushörner (Abbildung 4A) wurden in eine Petrischale mit 30 mm Durchmesser transferiert, die 37°C-warmes Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM; 10% fetales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin; PPA, Cölbe, Deutschland) enthält. Zusätzlich befand sich auf dem Boden der Petrischale eine sterile Korkplatte.

Die Uterushörner wurden mit Hilfe einer Mikroschere der Länge nach unter dem Operationsmikroskop aufgeschnitten und mit der Innenseite, das heißt dem luminalen Epithel des Endometriums, nach unten auf die Korkplatte mit Hilfe von vier 26G Nadeln aufgespannt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Entfernung des oberliegenden Perimetrium mit darüber liegendem Myometrium. Vom nun freiliegenden, basalen Endometrium konnten kleine Fragmente mittels einer Mikroschere exzidiert werden. Diese wurden dann in eine weitere Petrischale mit 37°C-warmem DMEM überführt und in gleich große Fragmente mit 1 mm Durchmesser zugeschnitten (Abbildung 4B). Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 2 Tropfen des Fluoreszenzfarbstoffs Bisbenzimid (H33342; 200 µg/ml; Molekulargewicht (MG) 562; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Nach Transplantation der Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer ermöglichte dieser Fluoreszenzfarbstoff die Differenzierung des Endometriumgewebes vom umgebenden nichtgefärbten Gewebe. Nach zwei Minuten wurden die Endometriumfragmente in 37°C-warmes Bisbenzimid-freies DMEM transferiert.



**Abbildung 4:** Isoliertes Uterushorn (A). Zugeschnittene Endometriumfragmente (B). Maßstab: A = 2 mm, B = 1 mm.

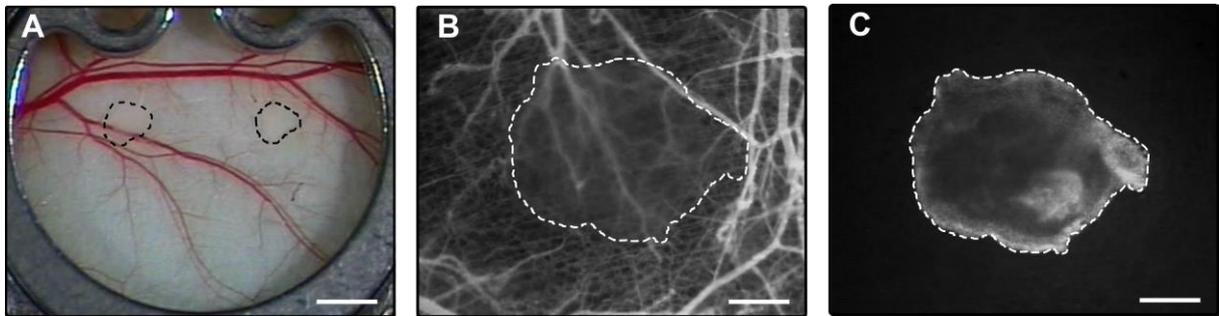
### 5.3.4 Transplantation von Endometrium

Zur syngen Transplantation des Endometriumgewebes wurden die Mäuse mit Rückenhautkammer in narkotisiertem Zustand in Seitenlage auf einer speziell konstruierten Plexiglasbühne an der Rückenhautkammer mit einem Faden fixiert. Dies ermöglichte die optimale seitliche Lagerung der Tiere. Der Sprengring und das runde Deckglas des Beobachtungsfensters wurden entfernt und die Kammer zunächst mit steriler 0,9%-iger

Kochsalzlösung ausgiebig gespült. Nun konnten unter dem Operationsmikroskop zwei der gewonnenen Endometriumfragmente in ausreichendem Abstand zueinander auf die quergestreifte Hautmuskulatur transplantiert werden. Anschließend wurde die Kammer mit einem neuen Deckglas und einem neuen Sprengring wieder luftdicht verschlossen (Abbildung 5A).

#### 5.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

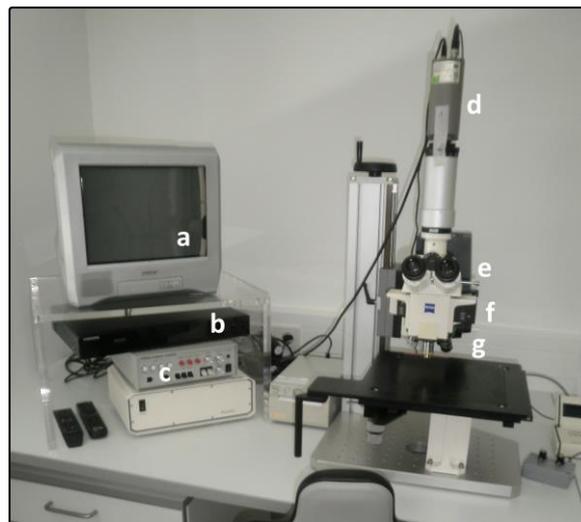
Um den Prozess der Angiogenese in den sich entwickelnden Endometrioseherden zu untersuchen, wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Diese Technik ermöglicht die Analyse verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter.



**Abbildung 5:** Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer direkt nach der Transplantation zweier Endometriumfragmente (gestrichelte Linie) (A). Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines Endometriumfragments direkt nach Transplantation (B, C). Nach i.v. Injektion von 0,1 ml des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran werden unter Blau-Licht-Epi-Illumination die Gefäße der Rückenhautkammer um das Endometriumfragment (gestrichelte Linie) sichtbar (B). Unter ultraviolettem Licht ist das mit Bisbenzimid angefärbte Endometriumfragment (gestrichelte Linie) gut erkennbar (C). Maßstab: A = 1,3 mm; B, C = 250 µm.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 5B und C) wurde an den narkotisierten Mäusen an Tag 0 direkt nach der Transplantation der Endometriumfragmente sowie an Tag 3, 6, 10 und 14 durchgeführt. Die Narkose hierfür erfolgte jeweils durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (75 mg/kg; Ursotamin®; Serumwerke Bernburg) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun®; Bayer). Die Mäuse wurden anschließend auf einer Plexiglasbühne in Seitenlage fixiert, sodass sich die Rückenhautkammer zum Mikroskopieren in horizontaler Lage befand. Im Anschluss erfolgte bei jedem Tier die retrobulbäre Injektion von 0,1 ml des Fluoreszenzfarbstoffs 5% Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran (MG 150 kD; Sigma-Aldrich). Dieser Farbstoff verstärkt durch Anfärben des Blutplasmas den Kontrast in den Blutgefäßen, da er wegen seines hohen Molekulargewichts unter physiologischen Bedingungen intravasal verbleibt (Abbildung 5B). Unter ultraviolettem Licht wurden die mit Bisbenzimid angefärbten Endometriumfragmente sichtbar (Abbildung 5C). Zur Mikroskopie

wurde ein Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen Deutschland) mit Auf- und Durchlichteinrichtung (Abbildung 6) verwendet. Das Mikroskop war mit einer 100 W Quecksilberdampfampe sowie mit blauen, grünen und ultravioletten Filterblöcken ausgestattet. Dies bewirkte die Anregung und Filterung des Lichtes mit verschiedenen Wellenlängen. Die mikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe einer Charged Coupled Device (CCD) Videokamera (FK-6990 IQS; Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland), die an einen DVD-Rekorder (LG-MS 800, Panasonic, Osaka, Japan) angeschlossen war, aufgenommen. Über einen Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan), der zwischen Kamera und Aufnahmegerät geschaltet war, konnte die Nummer des Versuchstiers und der Untersuchungszeitpunkt dokumentiert werden. Zur Aufnahme der mikroskopischen Bilder wurden 5x, 10x und 20x Objektive (Zeiss) mit langem Arbeitsabstand verwendet, die auf einen 14-Zoll Monitor (KV-14CTIE; Sony, Tokio, Japan) übertragen wurden. Dadurch wurde ein Vergrößerungsfaktor von 115, 230 und 460 erreicht.



**Abbildung 6:** Arbeitsplatz zur Durchführung der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie mit Monitor (a), DVD-Recorder (b), Timer (c), Videokamera (d), Fluoreszenzmikroskop (e) mit Filterblock (f) und Objektiven (g).

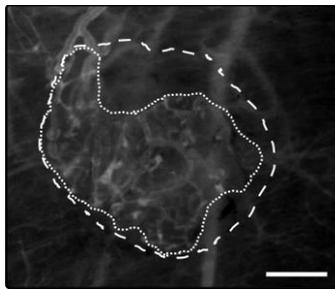
### 5.4.1 Mikrozirkulatorische Parameter

Die Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgte ausschließlich off-line, indem die Aufnahmen nach Beendigung der Versuche von DVD abgespielt und mit Hilfe des computergestützten Bildverarbeitungssystems CapImage (Dr. Zeintl Ingenieurbüro Heidelberg, Deutschland) analysiert wurden. Die Fläche der Transplantate sowie die Fläche der neu gebildeten Gefäßnetzwerke wurden mit Hilfe des 5x-Objektivs ausgewertet. Die Analyse der funktionellen Kapillardichte der neu gebildeten Gefäßnetzwerke erfolgte mittels des 10x-Objektivs und die restlichen Parameter, wie Gefäßdurchmesser,

Blutzellgeschwindigkeit und die Anzahl der Gefäßsprossen pro Fläche, wurden mit Hilfe des 20x-Objektivs ermittelt.

### **5.4.1.1 Fläche**

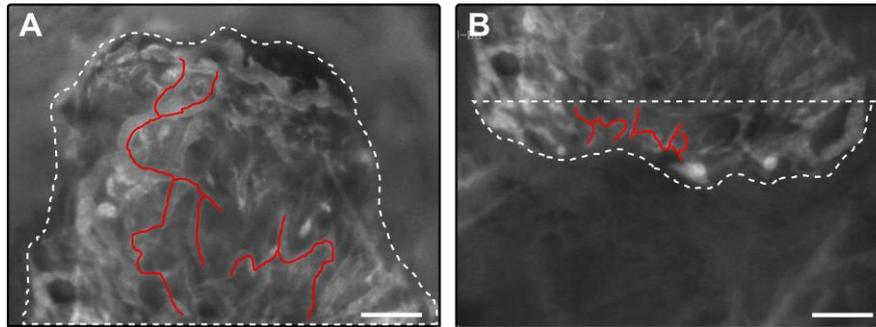
Zur Bestimmung der Transplantatgröße und der Fläche der vaskularisierten Gewebeareale der Endometriumfragmente wurden diese am Bildschirm durch Umfahren markiert (Abbildung 7). Daraus wurde anschließend der Flächeninhalt in mm<sup>2</sup> berechnet. Um die vaskularisierte Fläche der Transplantate in % zu ermitteln, wurden jeweils die vaskularisierten Gewebeareale und die Transplantatgrößen an den einzelnen Versuchszeitpunkten ins Verhältnis zueinander gesetzt.



**Abbildung 7:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran eines Endometrioseherds an Tag 3 nach Transplantation eines Endometriumfragments (gestrichelte Linie) in die Rückenhautkammer zur Darstellung der Bestimmung der vaskularisierten Fläche in % mit Markierung der gesamten Fläche (gestrichelte Linie) und Markierung der vaskularisierten Fläche des Transplantats (gepunktete Linie). Maßstab: 260 µm.

### **5.4.1.2 Funktionelle Kapillardichte**

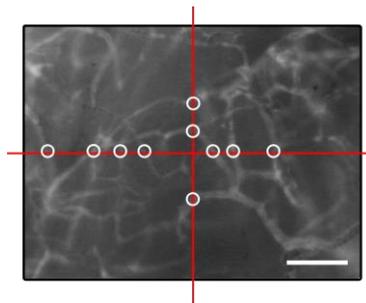
Die funktionelle Kapillardichte in cm/cm<sup>2</sup> wurde bei zehnfacher Vergrößerung aus dem Quotienten der Länge der digital nachgezogenen perfundierten Gefäße und der Fläche der sich entwickelnden Endometrioseherde berechnet (Abbildung 8). Da die Endometrioseherde in ihrer Größe ein Beobachtungsfeld überschritten, wurde die funktionelle Kapillardichte in zwei Beobachtungsfeldern, die sich nicht überschneiden, ausgewertet.



**Abbildung 8:** Intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran eines Endometrioseherds an Tag 6 nach Transplantation eines Endometriumfragments in die Rückenhautkammer zur Darstellung der Bestimmung der funktionellen Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  in zwei Bildausschnitten (A, B) mit Markierung der Fläche des Transplantats (gestrichelte Linie) und beispielhaft nachgefahrenen, perfundierten Gefäßen (rote Linien). Maßstab:  $110 \mu\text{m}$ .

#### 5.4.1.3 Gefäßdurchmesser

Die Messung des Gefäßdurchmessers in  $\mu\text{m}$  erfolgte zu jedem Untersuchungszeitpunkt an 10 Gefäßen je Transplantat. Diese 10 Gefäße wurden mit Hilfe eines virtuellen Achsenkreuzes randomisiert ausgewählt, wobei nur Gefäße gemessen wurden, die das Achsenkreuz schnitten (Abbildung 9). Das Achsenkreuz war auf eine Folie gezeichnet, die zur Auswertung auf den Bildschirm gelegt wurde. Aus den 10 gemessenen Gefäßdurchmessern wurde der Mittelwert errechnet. Der Plasma-Marker 5% FITC-Dextran ermöglichte dabei die exakte Identifizierung der Gefäßgrenzen, da dieser den Erythrozyten-freien Plasmasaum der Gefäße darstellt.



**Abbildung 9:** Intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran eines Endometrioseherds an Tag 6 nach Transplantation eines Endometriumfragments in die Rückenhautkammer zur Bestimmung der Gefäße, von denen der Gefäßdurchmesser und die Blutzellgeschwindigkeit gemessen wurden. Entlang des aufgelegten Achsenkreuzes (rote Linien) wurden 10 das Achsenkreuz kreuzende Gefäße (weiße Kreise) ausgewählt. Maßstab:  $100 \mu\text{m}$ .

#### 5.4.1.4 Blutzellgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit erfolgte an denselben Gefäßen, an denen bereits der Gefäßdurchmesser gemessen wurde. Sie wurde computerassistent mit Hilfe der

Line-Shift-Diagramm-Methode (Klyscz et al., 1997) durchgeführt. Hierzu wird in Richtung des Blutflusses eine Linie zentral in das Gefäßlumen gelegt und die DVD 10 Sekunden in Echtzeit abgespielt. Währenddessen wurden für jedes Halbbild die Grauwerte an der Messlinie durch das Computerprogramm ermittelt und in einem Bildspeicher abgespeichert. Daraus konnte der Computer im nächsten Schritt ein Line-Shift-Diagramm erstellen. Dies zeigte schräg verlaufende helle und dunkle Linien, die durch sich entlang der Messlinie bewegende Erythrozyten und Plasmalücken entstehen. Die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  wurde aus der Steigung dieser Linien berechnet.

#### **5.4.1.5 Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss**

Mit folgender Formel konnte aus der Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) und dem Gefäßdurchmesser ( $d$ ) der mikrovaskuläre Blutvolumenfluss berechnet werden:

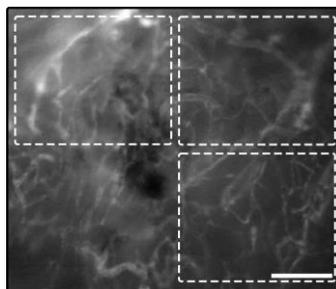
$$\text{Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss} = \pi \times \left(\frac{d}{2}\right)^2 \times \frac{v}{K}$$

K steht hierbei für den Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor (Baker und Wayland, 1974) und berücksichtigt das parabole Geschwindigkeitsprofil des Bluts in Mikrogefäßen.

Da die untersuchten Gefäße aufgrund ihres geringen Durchmessers von 5-20  $\mu\text{m}$  im Randbereich eine geringere Fließgeschwindigkeit als im Zentralstrom haben, würde die Berechnung zu einer Überschätzung des Blutvolumenflusses führen. Deshalb wurde nach Lipowsky und Zweifach für K der Wert 1,3 verwendet (Lipowsky und Zweifach, 1978).

#### **5.4.1.6 Anzahl der Gefäßsprossen pro Fläche**

Zur Bestimmung der Anzahl der Gefäßsprossen/ $\text{mm}^2$  Endometrioseherd wurden in einer Übersichtsaufnahme unter dem 10x Objektiv drei Beobachtungsfelder festgelegt (Abbildung 10). Anschließend wurden unter dem 20x Objektiv alle sichtbaren Gefäßsprossen pro Herd in den Beobachtungsfeldern gezählt und durch die dort gemessene Fläche in  $\text{mm}^2$  geteilt.



**Abbildung 10:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran eines Endometrioseherds an Tag 6 nach Transplantation eines Endometriumfragments in die Rückenhautkammer zur Darstellung der Auszählung von Gefäßsprossen in 3 Beobachtungsfeldern (gestrichelte Linien). Maßstab: 130  $\mu\text{m}$ .

## 5.5 Histologie

### 5.5.1 Konventionelle Histologie

Nach Beendigung der jeweiligen Versuchsreihe an Tag 14 wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Narkose eingeschläfert. Anschließend wurden die Rückenhautkammergewebe samt Transplantaten exzidiert und für 24 Stunden in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C fixiert. Dann erfolgte deren Einbettung in Paraffin, sodass 3 µm dicke Serienschnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden nach Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt alle sauren/basophilen Strukturen, wie DNA und Zellkerne, blau und Eosin alle basischen/acidophilen Strukturen, wie Zellplasmaproteine, rot an.

### 5.5.2 Immunhistochemie

Zur Darstellung proliferierender Zellen wurden die Schnitte immunhistochemisch mit einem monoklonalen Maus-anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-Antikörper (1:100; DakoCytomotion, Hamburg, Deutschland) markiert. Im Anschluss wurde als passender sekundärer Antikörper ein mit Peroxidase markierter polyklonaler Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:100; DakoCytomotion) hinzugegeben. Als Farbstoff wurde 3'3-Diaminobenzidin verwendet. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und unter dem Lichtmikroskop (BX60, Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Um den Anteil der proliferierenden Zellen in % im Stroma und in den Drüsen der Endometrioseherde zu ermitteln, wurden zuerst alle in den Herden befindlichen positiv gefärbten Zellkerne im Stroma bzw. in den Drüsen gezählt. Diese Zahl wurde anschließend ins Verhältnis zu allen vorhandenen Zellkernen im Stroma und in den Drüsen gesetzt.

Um immunhistochemisch zwischen den bereits in den Endometriumfragmenten existierenden GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäßen und den aus dem umgebenden Gewebe einwachsenden GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäßen unterscheiden zu können, wurden die Schnitte, wie im Folgenden erklärt, gefärbt. Alle Schnitte wurden in Coplin Laborgefäße mit 0,05% Citraconic Anhydrid Lösung (pH 7,4) für 1 Stunde bei 98°C in ein Wasserbad gelegt. Zur Darstellung der Endothelzellen wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Ratte-anti-Maus-Antikörper gegen den Endothelzellmarker CD31 (1:100; Dianova GmbH) über Nacht bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein polyklonaler Ziege-anti-Ratte Alexa 555 Antikörper (1:200; Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) für 1 Stunde bei 37°C hinzugegeben. Zur Steigerung der GFP-Fluoreszenz erfolgte zusätzlich die Färbung mit einem polyklonalen Ziege-anti-Ziege-GFP-Antikörper (1:200, Rockland Immunochemicals, Limmerick, USA) als primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde als sekundärer Antikörper ein mit Biotin markierter polyklonaler Esel-anti-Ziege-Antikörper (1:100; Dianova) für 1 Stunde bei 37°C hinzugefügt. Dieser Antikörper wurde mittels Alexa448-

markiertem Streptavidin (1:50, Thermo Fisher Scientific GmbH) nachgewiesen. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) gefärbt. Zur quantitativen Erfassung der Gefäßdichte aller CD31<sup>+</sup> Gefäße und der Dichte der GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße wurden die Schnitte an einem BX60-Mikroskop (Olympus) analysiert.

## 5.6 Experimentelles Protokoll

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von DAPT auf die Angiogenese in Endometrioseherden zu untersuchen. Hierfür wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die sich durch die Spendermäuse zur Gewinnung der Endometriumfragmente unterschieden. In Versuchsreihe I stammten die Endometriumfragmente aus C57BL/6-Spendermäusen, wohingegen in Versuchsreihe II C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Spendermäuse verwendet wurden. Hierdurch war es in der Versuchsreihe II möglich, GFP-positive Endometriumfragmente zu transplantieren, sodass immunhistochemisch zwischen den bereits in den Endometriumfragmenten existierenden GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäßen und den aus dem umgebenden Gewebe einwachsenden GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäßen unterschieden werden konnte.

### 5.6.1 Versuchsablauf

#### 5.6.1.1 Versuchsreihe I

Mittels Vaginalzytologie wurden für die Kammerpräparation insgesamt 16 C57BL/6-Empfängermäuse, die sich alle im Diöstrus (*siehe 5.2*) befanden, ausgewählt. Nach abgeschlossener Präparation der Rückenhautkammer konnten sich alle Mäuse für 48 Stunden vom operativen Trauma erholen, sodass sie zum Transplantationszeitpunkt im Östrus waren. Zur Transplantation wurden jeweils 2 Endometriumfragmente in jede der 16 Rückenhautkammern transplantiert. Die Endometriumfragmente wurden aus Uterushörnern von insgesamt 4 C57BL/6-Spendermäusen, die sich ebenfalls im Östrus befanden, gewonnen. Ab dem Tag der Transplantation wurde jeweils 8 Empfängermäusen 1x täglich entweder 10 mg/kg DAPT (Sigma-Aldrich) oder 10 mg/kg in Maiskeimöl gelöstes 10%-iges Ethanol als Vehikel in einem Volumen von 100 µl intraperitoneal injiziert. Im Verlauf des Versuchs wurde täglich das Aussehen der Rückenhautkammer und der darin befindlichen Transplantate beurteilt und dokumentiert.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde am Tag der Transplantation (Tag 0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 durchgeführt. Hierfür wurde allen narkotisierten Versuchstieren direkt vor der Mikroskopie 0,1 ml des Fluoreszenzfarbstoffs 5% FITC-Dextran (Sigma-Aldrich) in den retrobulbären Venenplexus injiziert.

Es konnten folgende Parameter untersucht werden:

- 1) Transplantatgröße (*siehe 5.4.1.1*)
- 2) Fläche der revaskularisierten Gewebeareale (*siehe 5.4.1.1*)
- 3) Funktionelle Kapillardichte (*siehe 5.4.1.2*)
- 4) Durchmesser neu gebildeter Gefäße (*siehe 5.4.1.3*)
- 5) Blutzellgeschwindigkeit (*siehe 5.4.1.4*)
- 6) Mikrovaskulärer Blutvolumenfluss (*siehe 5.4.1.5*)
- 7) Anzahl der Gefäßsprossen pro Fläche (*siehe 5.4.1.6*)

An Tag 14 der Versuchsreihe wurden die Versuchstiere mittels einer Überdosis Narkose eingeschläfert. Im Anschluss erfolgte die Anfertigung histologischer Schnitte aus den Rückenhautkammerpräparaten.

### **5.6.1.2 Versuchsreihe II**

In dieser Versuchsreihe erfolgte die Präparation der Kammer nach dem gleichen Protokoll wie in Versuchsreihe I. Mittels Vaginalzytologie wurden für die Kammerpräparation insgesamt 18 C57BL/6-Empfängermäuse, die sich alle im Diöstrus (*siehe 5.2*) befanden, ausgewählt. Nach abgeschlossener Präparation der Rückenhautkammer konnten sich alle Mäuse für 48 Stunden vom operativen Trauma erholen, sodass sie zum Transplantationszeitpunkt im Östrus waren. Zur Transplantation wurden jeweils 2 Endometriumfragmente in jede der 18 Rückenhautkammern transplantiert. Die Endometriumfragmente wurden aus Uterushörnern von insgesamt 4 C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J-Spendermäusen, die sich ebenfalls im Östrus befanden, gewonnen. Ab dem Tag der Transplantation wurde jeweils 9 Empfängermäusen 1x täglich entweder 10 mg/kg DAPT (Sigma-Aldrich) oder 10 mg/kg in Maiskeimöl gelöstes 10%iges Ethanol als Vehikel in einem Volumen von 100 µl intraperitoneal injiziert. Im Verlauf des Versuchs wurde täglich das Aussehen der Rückenhautkammer und der darin befindlichen Transplantate beurteilt und dokumentiert. An Tag 3, 6 und 14 wurden jeweils 3 Tiere pro Gruppe mit einer Überdosis Narkose eingeschläfert. Im Anschluss erfolgte die Anfertigung histologischer Schnitte aus den Rückenhautkammerpräparaten.

## **5.7 Statistik**

Die elektronische Verarbeitung der Datensätze erfolgte unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2007 (Microsoft Office; Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Sämtliche Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) aufgeführt, wobei die Mittelwerte der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter an den entsprechenden Untersuchungstagen aus den Einzelwerten der transplantierten Endometriumfragmente kalkuliert wurden.

Zum Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde ein Student's t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Mit Hilfe einer One-Way Analysis of Variance (ANOVA) wurden zeitliche Effekte innerhalb einer Gruppe getestet. Im Anschluss erfolgte ein Student-Newman-Keuls post hoc Test, der die Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni für wiederholte Messungen beinhaltet.

Für die Auswertung wurde die Software SigmaPlot 11.0 (SigmaStat, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet.

Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden bei der Auswertung als statistisch signifikant betrachtet.

## 6. Ergebnisse

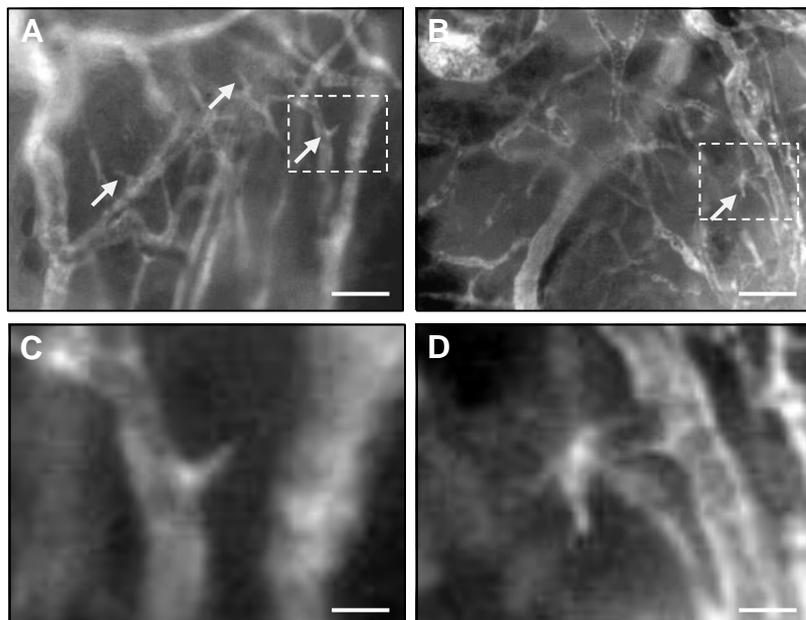
### 6.1 Versuchsreihe I

#### 6.1.1 Entwicklung der Transplantate

Die Endometriumfragmente wiesen nach der Transplantation in die Rückenhautkammer am Tag 0 sowohl in der Kontroll- als auch in der DAPT-Gruppe eine vergleichbare Größe von  $0,97 \pm 0,05 \text{ mm}^2$  bzw.  $0,96 \pm 0,03 \text{ mm}^2$  auf. Die Transplantatgröße veränderte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen nur geringfügig. Bezogen auf Tag 0 lag die Endgröße der Transplantate an Tag 14 in der DAPT-Gruppe bei  $115 \pm 7 \%$  und in der Kontrollgruppe bei  $104 \pm 5 \%$ . Somit zeigte sich im statistischen Vergleich der beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied.

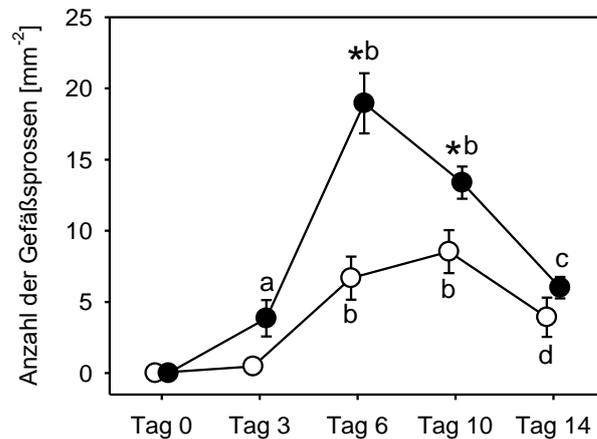
#### 6.1.2 Gefäßsprossen

Die Anzahl der Gefäßsprossen nahm in den sich neu entwickelnden Gefäßnetzwerken innerhalb der Transplantate in beiden Gruppen zu Beginn der Versuchsreihe zu und erreichte die höchsten Werte an Tag 6 und 10 (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran des sich neu entwickelnden Gefäßnetzwerks in Endometrioseherden an Tag 6 nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (**A, C**) und der Kontrollgruppe (**B, D**). Das mikrovaskuläre Netzwerk der DAPT-Gruppe enthält mehr Gefäßsprossen (**A**, Pfeile) im Vergleich zur Kontrollgruppe (**B**, Pfeil). Vergrößerung der Gefäßsprossen aus **A** und **B** (gestrichelte Linie) (**C, D**). Maßstab: A, B = 270  $\mu\text{m}$ ; C, D = 68  $\mu\text{m}$ .

In der DAPT-Gruppe war die Anzahl der Gefäßsprossen im Vergleich zur Kontrollgruppe am 6. und 10. Tag signifikant erhöht (Abbildung 12). Am 14. Tag, dem Ende des Beobachtungszeitraums, nahm die Anzahl der Gefäßsprossen wieder ab und es konnte kein Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

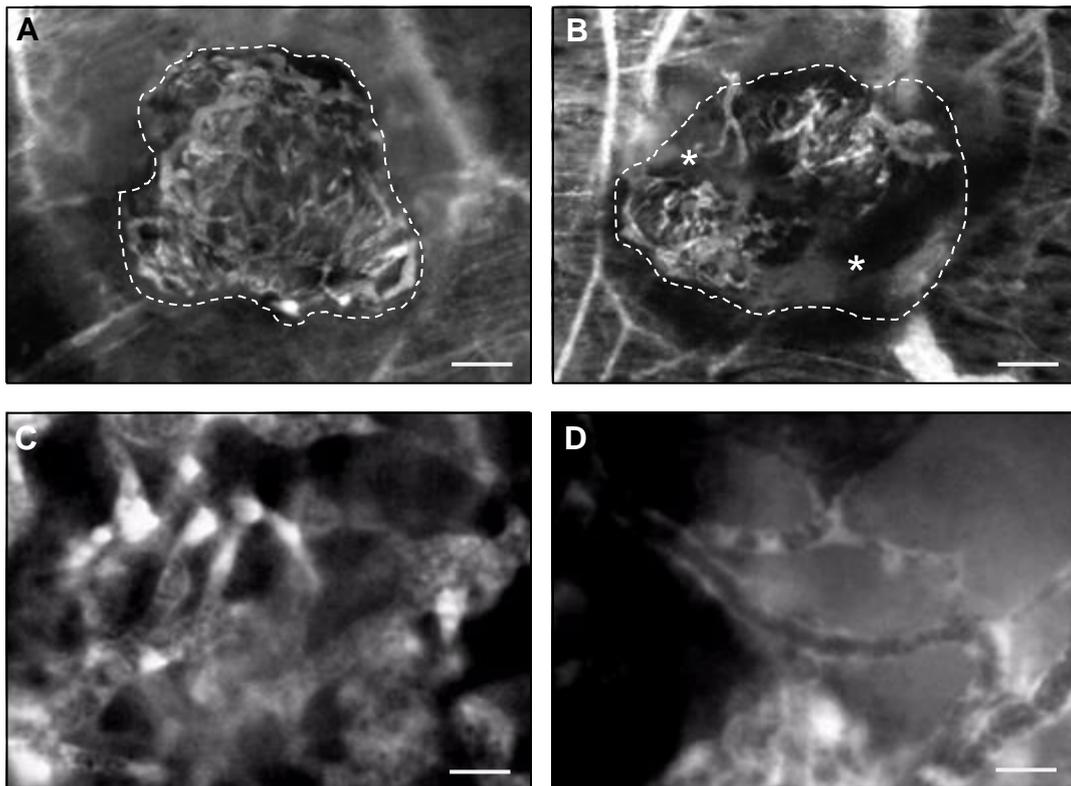


**Abbildung 12:** Anzahl der Gefäßsprossen [mm<sup>-2</sup>] in Endometrioseherden nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (schwarze Kreise, n = 8) und Kontrollgruppe (weiße Kreise, n = 8). Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 versus (vs.) Kontrollgruppe, <sup>a</sup>p < 0,05 vs. Tag 0, <sup>b</sup>p < 0,05 vs. Tag 0 und 3, <sup>c</sup>p < 0,05 vs. Tag 0, 6 und 10, <sup>d</sup>p < 0,05 vs. Tag 10.

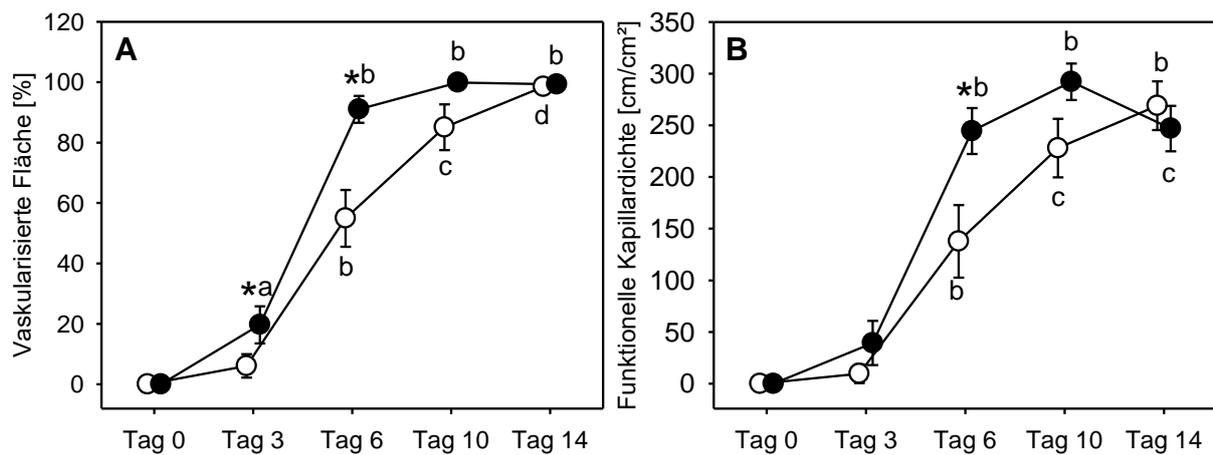
### 6.1.3 Mikrovaskuläres Netzwerk

Bereits am 3. Tag nach Transplantation der Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer konnten sowohl in der DAPT- als auch der Kontrollgruppe perfundierte Blutgefäße nachgewiesen werden. Allerdings erfolgte die Vaskularisierung in den mit DAPT-behandelten Tieren schneller als in der Kontrollgruppe. Am 3. und 6. Tag zeigten die Herde der DAPT-Gruppe eine signifikant größere vaskularisierte Fläche (Abbildung 13). Am Ende der Versuchsreihe an Tag 14 wiesen beide Gruppen keinen Unterschied mehr auf. Die Endometrioseherde waren in beiden Versuchsgruppen zu 100 % vaskularisiert (Abbildung 14).

Dies spiegelt sich auch in der funktionellen Kapillardichte wider. In der DAPT-Gruppe nahm die funktionelle Kapillardichte in den Endometrioseherden schneller zu und war am 6. Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Am Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums zeigte sich allerdings kein Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen. Hier lag die funktionelle Kapillardichte in den DAPT-behandelten Tieren bei  $247 \pm 22$  cm/cm<sup>2</sup> und in der Kontrollgruppe bei  $269 \pm 24$  cm/cm<sup>2</sup> (Abbildung 14).



**Abbildung 13:** Intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Blau-Licht-Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran der Endometrioseherde an Tag 6 nach Transplantation von Endometriumfragmenten (gestrichelte Linie) in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (A, C) und der Kontrollgruppe (B, D). Die Herde der DAPT-Gruppe sind schon vollständig revaskularisiert (A), während sich in den Herden der Kontrollgruppe noch avaskuläre Bereiche (Sternchen) befinden (B). Dies spiegelt sich auch in einer verminderten Gefäßdichte in der Kontrollgruppe (D) im Vergleich zur DAPT-Gruppe (C) wider. Maßstab: A, B = 240 µm; C, D = 70 µm.



**Abbildung 14:** Vaskularisierte Fläche [%] (A) und funktionelle Kapillardichte [cm/cm<sup>2</sup>] (B) der Endometrioseherde nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (schwarze Kreise, n = 8) und Kontrollgruppe (weiße Kreise, n = 8). Mittelwerte ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, <sup>a</sup>p < 0,05 vs. Tag 0, <sup>b</sup>p < 0,05 vs. Tag 0 und 3, <sup>c</sup>p < 0,05 vs. Tag 0, 3 und 6, <sup>d</sup>p < 0,05 vs. Tag 0, 3, 6 und 10.

#### 6.1.4 Mikrohämodynamik

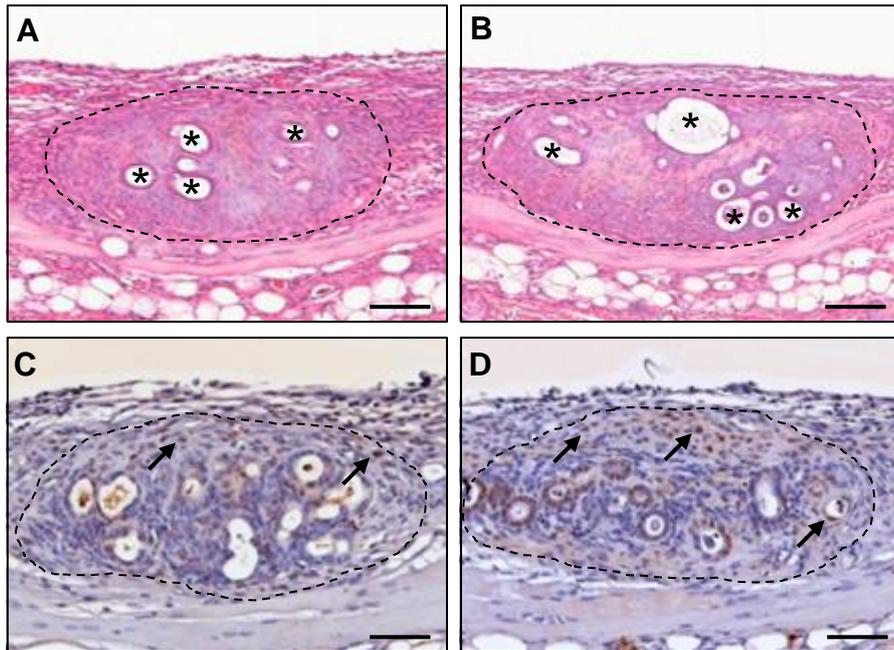
Während des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen wiesen die Gefäße innerhalb der sich entwickelnden Endometrioseherde einen Durchmesser von 10 bis 16  $\mu\text{m}$  ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Tabelle 1). In der Kontrollgruppe stieg sowohl die Blutzellgeschwindigkeit als auch der berechnete mikrovaskuläre Blutvolumenfluss mit Maximalwerten von  $243,7 \pm 46,3 \mu\text{m/s}$  und  $20,9 \pm 4,9 \text{ pl/s}$  an Tag 10 kontinuierlich an. Im Vergleich dazu waren die Blutzellgeschwindigkeit und der mikrovaskuläre Blutvolumenfluss in der DAPT-Gruppe am 6. Tag signifikant erhöht. Am Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 14 waren die Werte in beiden Gruppen jedoch vergleichbar (Tabelle 1).

	Tag 3	Tag 6	Tag 10	Tag 14
<i>Durchmesser [<math>\mu\text{m}</math>]:</i>				
Kontrolle	$11,1 \pm 2,2$	$14,3 \pm 1,4$	$11,6 \pm 0,5$	$10,6 \pm 0,3$
DAPT	$15,1 \pm 0,8$	$15,5 \pm 0,9$	$12,0 \pm 0,4^a$	$10,3 \pm 0,3^b$
<i>Blutzellgeschwindigkeit [<math>\mu\text{m/s}</math>]:</i>				
Kontrolle	$31,7 \pm 17,7$	$107,4 \pm 19,6$	$243,7 \pm 46,3$	$221,7 \pm 34,4$
DAPT	$134,1 \pm 56,3$	$237,3 \pm 37,4^*$	$253,0 \pm 30,2$	$224,4 \pm 33,1$
<i>Blutvolumenfluss [<math>\text{pl/s}</math>]:</i>				
Kontrolle	$3,0 \pm 2,3$	$12,8 \pm 3,0$	$20,9 \pm 4,9$	$15,4 \pm 3,0$
DAPT	$19,6 \pm 8,6$	$37,7 \pm 9,2^*$	$22,0 \pm 2,9$	$14,5 \pm 2,4$

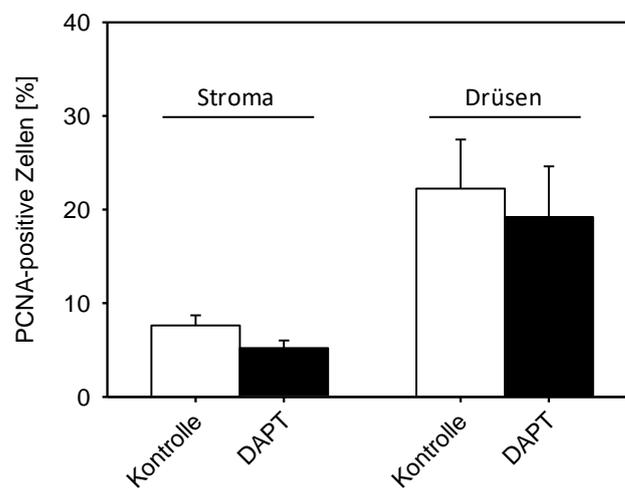
**Tabelle 1:** Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ], Blutzellgeschwindigkeit [ $\mu\text{m/s}$ ] und berechneter mikrovaskulärer Blutvolumenfluss [ $\text{pl/s}$ ] der neu gebildeten Gefäße in den Endometrioseherden nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe ( $n = 8$ ) und der Kontrollgruppe ( $n = 8$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe, <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 3 und 6, <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs. Tag 3, 6 und 10.

#### 6.1.5 Histologie

Bei der histologischen Untersuchung an Tag 14 zeigten sich in beiden Gruppen typische Endometrioseherde mit von vaskularisiertem Stroma umgebenen, zystenähnlich dilatierten Drüsen (Abbildung 15). Weder in den Drüsen noch im Stroma konnte bei der Färbung der Endometrioseherde mit dem Proliferationsmarker PCNA ein Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Dies zeigt, dass sich zum Ende des Beobachtungszeitraums die Proliferationsaktivität in den Herden beider Gruppen nicht unterschied (Abbildung 16).



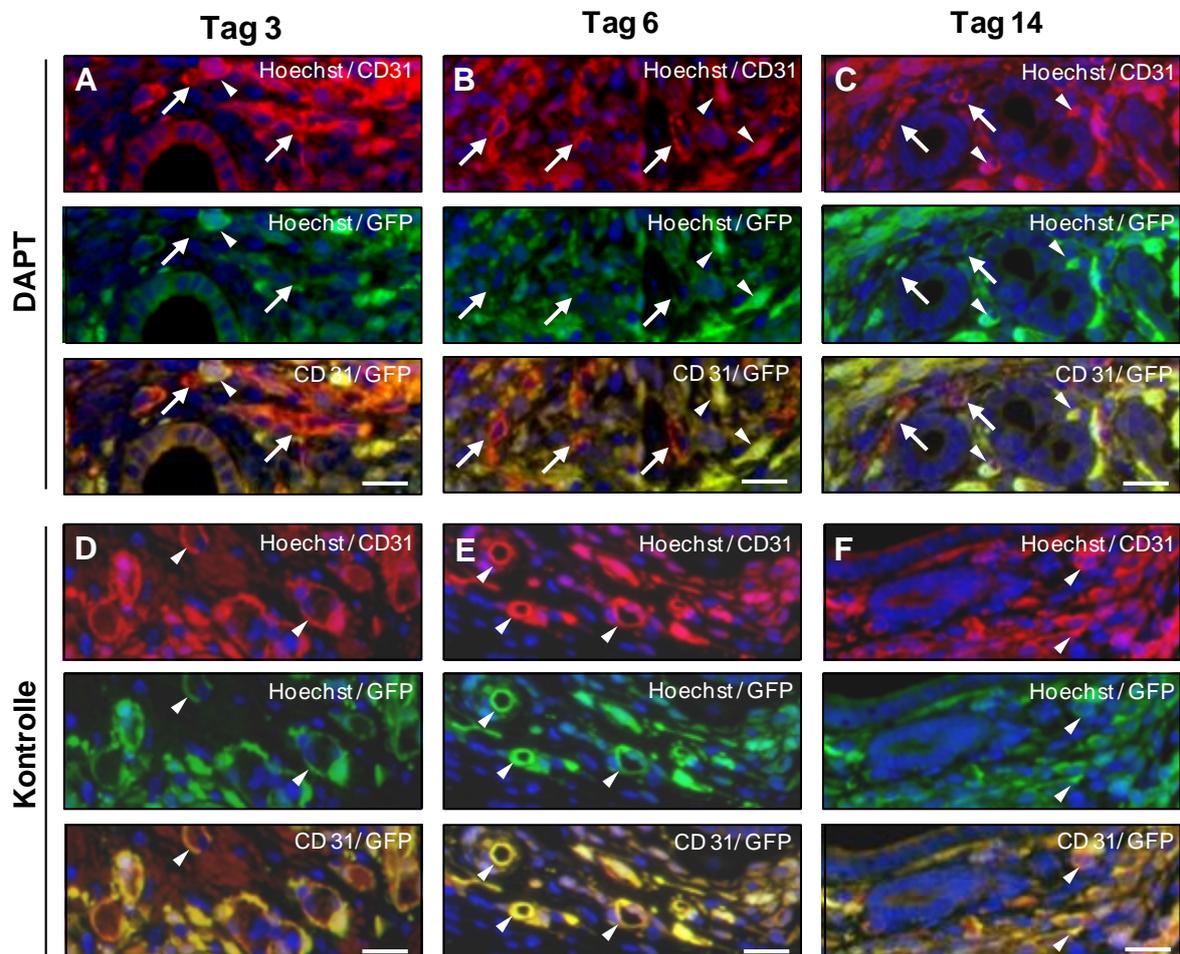
**Abbildung 15:** Histologische Schnitte der Endometrioseherde (gestrichelte Linie) an Tag 14 nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (**A, C**) und Kontrollgruppe (**B, D**). Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte (**A, B**) zeigen in beiden Gruppen typische Endometrioseherde mit zystenähnlich dilatierten Drüsen (Sternchen), die von vaskularisiertem Stroma umgeben sind. Der immunohistochemische Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA zeigt, dass die Endometrioseherde beider Gruppen eine vergleichbare Anzahl proliferierender stromaler und glandulärer Zellen (**C, D**, Pfeile) enthalten. Maßstab: A, B = 175 µm; C, D = 124 µm.



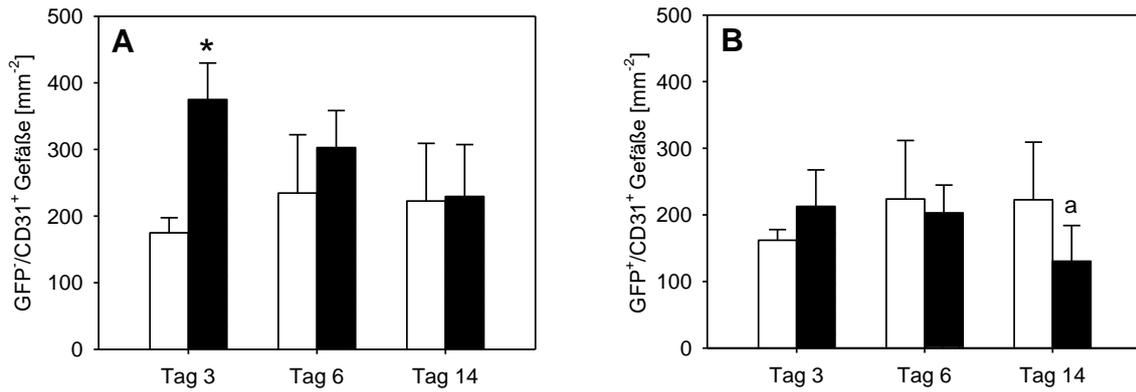
**Abbildung 16:** PCNA-positive Zellen [%] im Stroma und in den Drüsen der Endometrioseherde an Tag 14 nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (schwarze Balken, n = 8) und Kontrollgruppe (weiße Balken, n = 8). Mittelwert ± SEM.

## 6.2 Versuchsreihe II

Mit Hilfe der Immunhistochemie war es in dieser Versuchsreihe möglich, zwischen den ursprünglich in den transplantierten Endometriumfragmenten enthaltenen GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäßen und den aus der Umgebung eingewachsenen GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäßen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation zu unterscheiden (Abbildung 17). An Tag 3 zeigten die Herde der DAPT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Dichte der GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße. Dies zeigt, dass durch das frühe Einwachsen von GFP<sup>-</sup> Gefäßen aus dem umgebenden Gewebe die Herde der DAPT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine schnellere Vaskularisierung aufwies. Die Dichte der GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße war sowohl in der DAPT-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe vergleichbar (Abbildung 18).



**Abbildung 17:** Immunhistochemische Schnitte von Endometrioseherden an Tag 3 (A, D), Tag 6 (B, E) und Tag 14 (C, F) nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (A-C) und Kontrollgruppe (D-F). Die Zellkerne (A-F, blau) wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Des Weiteren wurde ein Antikörper zur Markierung von CD31 in den Endothelzellen (A-F, obere Reihe, rot) und ein Antikörper gegen GFP (A-F, mittlere Reihe, grün) verwendet. Die untere Reihe zeigt übereinander gelegte Aufnahmen der oberen und mittleren Reihe. GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße (A-F, Pfeilköpfe) sind in den Endometrioseherden beider Gruppen vorhanden. Im Gegensatz dazu ließen sich GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße (A-C, Pfeile) vor allem in den Schnitten der DAPT-Gruppe nachweisen. Maßstab = 21 µm.

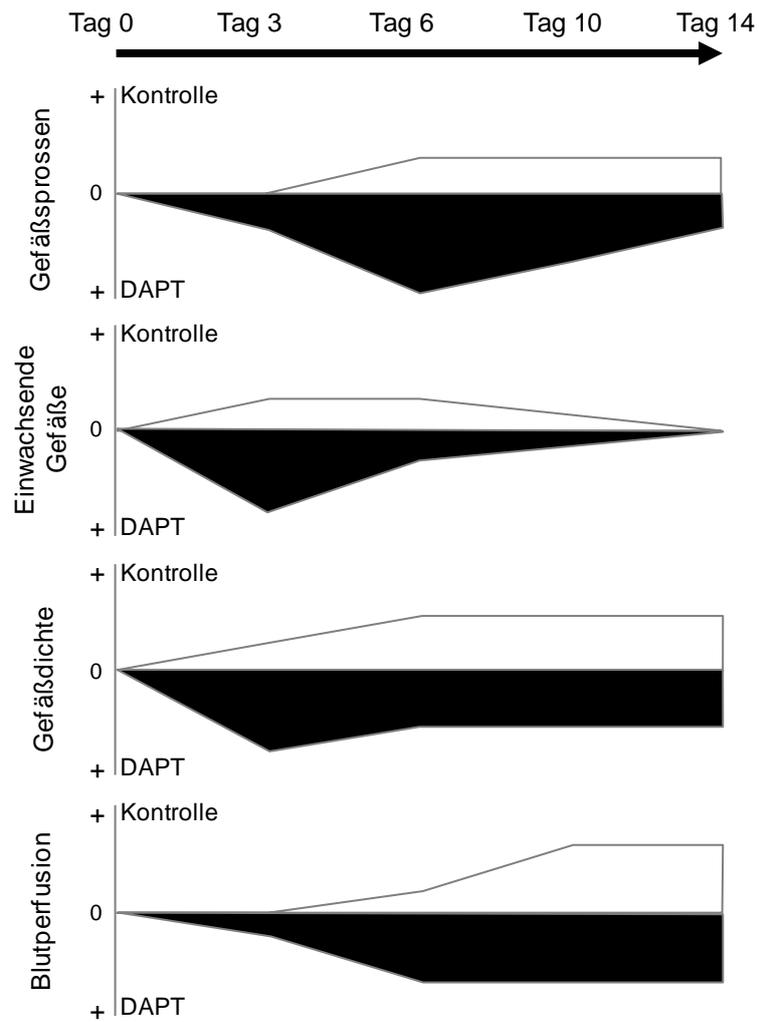


**Abbildung 18:** GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße [mm<sup>-2</sup>] **(A)** und GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße [mm<sup>-2</sup>] **(B)** der Endometrioseherde nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (schwarze Balken, n = 3) und Kontrollgruppe (weiße Balken, n = 3) an Tag 3, 6 und 14. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Kontrollgruppe, <sup>a</sup>p < 0,05 vs. Tag 3 und 6.

### 6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der Rückenhautkammer an Mäusen verwendet, um zu analysieren, welche Wirkung die Hemmung des Notch-Signalwegs auf die Angiogenese in Endometrioseherden hat. Hierfür wurde eine Gruppe von Mäusen mit dem Notch-Inhibitor DAPT und eine Kontrollgruppe mit Vehikel behandelt. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse (Abbildung 19) (Körbel et al., 2018):

- 1) Die Hemmung des Notch-Signalwegs durch DAPT bewirkte eine signifikant vermehrte Bildung von Gefäßsprossen in Endometrioseherden an Tag 3 nach Induktion in der DAPT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Notch-Signalweg wesentlich an der Angiogenese in Endometrioseherden beteiligt ist und dass durch die Hemmung des Notch-Signalwegs vermehrt Tip-Zellen gebildet werden.
- 2) Die Hemmung des Notch-Signalwegs führte zu einer schnelleren Vaskularisierung der Endometrioseherde in der DAPT-Gruppe, sodass sie an Tag 3 und 6 eine signifikant größere vaskularisierte Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies. Die schnellere Vaskularisierung der Endometrioseherde in der DAPT-Gruppe zeigte sich auch in einer signifikant erhöhten funktionellen Kapillardichte an Tag 6. Das bedeutet, dass sich durch die Hemmung des Notch-Signalwegs schneller ein Gefäßnetzwerk in Endometrioseherden ausbildet. Sowohl in der DAPT- als auch der Kontrollgruppe zeigte sich eine vergleichbare Anzahl GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße. GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße ließen sich an Tag 3 in erhöhter Zahl in den Herden der DAPT-Gruppe nachweisen. Dies zeigt, dass zu diesem frühen Zeitpunkt vermehrt Gefäße aus dem umgebenden Gewebe der Endometrioseherde eingewachsen sind und dadurch zu einer schnelleren Vaskularisierung geführt haben.
- 3) Am Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 14 waren sowohl in der DAPT- als auch in der Kontrollgruppe alle Endometrioseherde zu 100% vaskularisiert. Somit kam es durch die Hemmung des Notch-Signalwegs in Endometrioseherden im Vergleich zu Tumorstudien interessanterweise nicht zu einer schlechteren Durchblutung der Herde.
- 4) Am Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 14 wiesen die Endometrioseherde der DAPT- und Kontrollgruppe eine typische Morphologie mit vaskularisiertem Stroma und zystenähnlichen, dilatierten Drüsen auf. Die Endometrioseherde der DAPT- und der Kontrollgruppe unterschieden sich auch nicht in der Proliferationsaktivität. Das bedeutet, dass die Hemmung des Notch-Signalwegs keinen Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum der Endometrioseherde hatte.



**Abbildung 19:** Schematisch dargestellte Zusammenfassung der Ergebnisse mit Vergleich der Gefäßsprossen, einwachsenden Gefäße, Gefäßdicke und Blutperfusion (das Ausmaß ist in einer Skala von 0 bis + dargestellt) während der Vaskularisierung der Endometrioseherde von Tag 0 bis Tag 14 nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer der DAPT-Gruppe (schwarze Kurve) und Kontrollgruppe (weiße Kurve).

## 7. Diskussion

### 7.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1 Diskussion des Modells

Die Kombination des Rückenhautkammermodells mit der Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Analyse der Mikrozirkulation des freipräparierten, quergestreiften Hautmuskels und des darunter liegenden Subkutangewebes mit terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen (Menger et al., 2002). Es gibt verschiedene Modelle, um die Mikrozirkulation an unterschiedlichen Organen und Geweben, wie unter anderem am Knochen (Winet, 1989; Hansen-Algenstaedt et al., 2005), Gehirn (Wahl et al., 1985), Lunge (Kuebler et al., 1997), Herz (Vollmar et al., 1995), Leber (Vollmar et al., 1998; Keller et al., 2005), Pankreas (Menger et al., 1996) und Milz (Schmidt et al., 1990), zu untersuchen. Diese Modelle lassen sich in akute und chronische Modelle unterteilen. Bei den akuten Modellen werden zum Beispiel der Cremastermuskel der Ratte (Thorlacius et al., 1997) oder die Backentasche des Hamsters (Falabella et al., 2009) präpariert. Da hierbei die präparierte Gewebeschicht sehr dünn ist, kann ein Durchlichtmikroskop zur Analyse verwendet werden (Jakobsson et al., 1994). Nachteilig bei diesen akuten Modellen ist jedoch, dass sowohl die Narkose des Tiers (Menger und Lehr, 1993) als auch das chirurgische Trauma (Fiebig et al., 1991) die gemessenen mikrohämodynamischen Parameter beeinträchtigen können (Yamauchi et al., 1999). Des Weiteren ist die Untersuchung der Mikrozirkulation nur in einem Zeitfenster von wenigen Stunden möglich (Menger et al., 2002). Aus diesem Grund wurden chronische Modelle entwickelt, zu denen auch die Rückenhautkammer zählt.

Die Implantation einer transparenten Beobachtungskammer wurde erstmals 1924 von Sandison am Kaninchenohr durchgeführt, um die Proliferation und das Verhalten lebender Zellen zu analysieren (Sandison, 1924). Im Laufe der Jahre wurde dieser Ansatz auf unterschiedliche Art und Weise modifiziert und 1943 von Algire an der Maus in Form einer Rückenhautkammer angewandt (Algire, 1943). Ein großer Nachteil dieser ersten Modelle war es, dass das zu untersuchende Gewebe vor allem aus Granulationsgewebe bestand, das sich im Rahmen eines Wundheilungsprozesses ausbildete. Somit konnte die Mikrozirkulation nicht unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden. In neueren Kammermodellen werden das Gewebe und die analysierten Parameter weder durch die Implantation der Kammer noch durch das Kammermaterial selbst beeinflusst (Menger et al., 2002).

Heute besteht die Rückenhautkammer aus zwei symmetrischen Titanrahmen. Dadurch weist sie einerseits ein niedrigeres Gewicht und andererseits eine gute Gewebeverträglichkeit auf, sodass die Belastung der Versuchstiere auf ein geringes Maß reduziert wird. Eine Erholungsphase nach der Kammerpräparation von 48 bis 72 Stunden ermöglicht es den Versuchstieren außerdem, sich von der Narkose und dem chirurgischen Trauma zu erholen (Menger et al., 2002). Somit kann eine negative Beeinflussung der gemessenen mikrovaskulären Parameter ausgeschlossen werden (Yamauchi et al., 1999). Aufgrund des entfernbaren Deckglases bietet sich zudem die Möglichkeit, Gewebe in die Kammer zu transplantieren und über einen Zeitraum von 2-3 Wochen in vivo mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie die darin stattfindende Entwicklung neuer Gefäßnetzwerke zu untersuchen. Dadurch ist eine quantitative Erhebung verschiedener, mikrohämodynamischer Parameter über die Zeit möglich (Laschke und Menger, 2007; Laschke und Menger, 2016).

Das Modell der Rückenhautkammer wird an Hamstern, Ratten und Mäusen angewandt (Papenfuss et al., 1979; Endrich et al., 1980; Lehr et al., 1993). Mit Hilfe dieses Modells wurde der Prozess der Angiogenese bereits in unterschiedlichen Geweben und Biomaterialien untersucht, wie beispielsweise Knochen (Funk et al., 1986), Tumoren (Strieth et al., 2004), Endometrioseherden (Laschke et al., 2011c; Feng et al., 2014; Nenicu et al., 2014) sowie chirurgischen Netzen und Scaffolds für das Tissue Engineering (Rücker et al., 2008; Laschke et al., 2009a). Die Verwendung von Mäusen gegenüber Ratten oder Hamstern für dieses Modell bietet den Vorteil, dass das Mäusegenom vollständig bekannt ist und dass zahlreiche Knockout-Stämme und transgene Tiere für verschiedene Untersuchungen zur Verfügung stehen (Menger et al., 2002). Zusätzlich sind auch viele Antikörper gegen Maus-spezifische Marker erhältlich (Lehr et al., 1993).

Um die Entwicklung neuer Gefäße in Endometrioseherden zu untersuchen, gibt es verschiedene Modelle. Das Chorionallantoismodell am Hühnerei zeichnet sich durch eine leichte Präparation und geringe Kosten aus. Außerdem kommt es nicht zu einer Abstoßung xenogener Transplantate, da in der frühen Embryonalentwicklung das Immunsystem noch nicht ausgebildet ist (Laschke und Menger, 2007). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die sich entwickelnden Endometrioseherde auf der Chorionallantoismembran leicht zugänglich sind und somit deren Vaskularisierung gut beobachtet werden kann (Grümmer, 2006). Nachteilig ist jedoch, dass man den Prozess der Angiogenese nur über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachten kann. Zusätzlich wird durch die Gewebetransplantation ein mechanisches Trauma ausgelöst, das eine Inflammation begünstigt. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass in diesem Modell embryonales Gewebe als Empfängergewebe dient, das sich von adultem Gewebe in seinem Wachstumsfaktorprofil unterscheidet (Laschke und Menger, 2007). Diesem Modell gegenüber stehen die intra- sowie extraperitonealen

Nagermodelle. Bei den intraperitonealen Nagermodellen werden über eine Laparotomie Endometriumfragmente an das Peritoneum des Versuchstiers angenäht (Becker et al., 2006; Olivares et al., 2011) oder direkt in die Bauchhöhle injiziert (Somigliana et al., 1999; Fainaru et al., 2008). Das Rückenhautkammermodell ist dagegen ein extraperitoneales Endometriosemodell. Bei diesem Modell werden die Endometriumfragmente nicht auf das Peritoneum innerhalb der Bauchhöhle, sondern auf den quergestreiften Muskel der Haut transplantiert. Es spiegelt somit nicht die physiologische Umgebung der Bauchhöhle wider. Dadurch wird die Interaktion zwischen Peritoneum und Endometrium nicht berücksichtigt. Zusätzlich unterscheiden sich die Konzentrationen pro- und anti-angiogener Faktoren in der Rückenhautkammer von denjenigen in der Peritonealflüssigkeit. Ein großer Vorteil der Rückenhautkammer ist jedoch, dass Endometrioseherde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zur wiederholten Analyse nicht-invasiv zugänglich sind. Dadurch kann schrittweise die angiogene Gefäßsprossung und Netzbildung in vivo visualisiert werden. Hinzu kommt, dass die quantitative Untersuchung mikrohämodynamischer Parameter möglich ist (Laschke und Menger, 2007). Deshalb wurde in der vorliegenden Studie das Rückenkammermodell gewählt, um die Wirkung des Notch-Inhibitors DAPT auf die Angiogenese in Endometrioseherden zu untersuchen. Bei der Präparation der Endometriumfragmente wurde darauf geachtet, dass sie kein luminales Epithel enthielten (Feng et al., 2014), da dieses als natürliche Barriere dient (Ochiel et al., 2008) und die Interaktion der Transplantate mit dem umliegenden Gewebe erschwert (Feng et al., 2014).

### **7.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken**

Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik kann die Mikrozirkulation des zu untersuchenden Gewebes in der Rückenhautkammer direkt visualisiert werden. Sie ist somit ideal dazu geeignet, dynamische Prozesse, wie die Entwicklung neuer Blutgefäße, in vivo darzustellen (Menger et al., 1994; Vajkoczy et al., 2000). Im Gegensatz dazu ermöglichen andere Verfahren, wie die Mikrosphärentechnik (Zwissler et al., 1991), die Xenon-Clearance-Technik (Hendel et al., 1983), die Thermographie (Saumet et al., 1986), die Technik zur Anfertigung von Mikrokorrosionspräparaten (Forsman und McCormack, 1992), Farbstofftechniken (Silverman et al., 1972), die photoelektrische Plethysmographie (Webster und Patterson, 1976), die Laser-Doppler-Flowmetrie (Chávez-Cartaya et al., 1995) oder die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (Conzen et al., 1988; Conzen et al., 1991) nur eine indirekte Analyse der Mikrozirkulation und wären für die vorliegende Arbeit somit ungeeignet gewesen.

Durch die Verwendung geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe ist es mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich, das Fließverhalten verschiedener Blutbestandteile, wie Leukozyten und Thrombozyten, zu beurteilen (Menger et al., 1992; Laschke et al., 2007;

Struthmann et al., 2009). Zusätzlich ist die Untersuchung der Änderung der Gefäßpermeabilität (Pries, 1988) sowie die Visualisierung von Zellschäden, wie Apoptose und Nekrose (Harris et al., 1997; Westermann et al., 1999), möglich. Am Ende einer Versuchsreihe können die aufgenommenen Bilder mit Hilfe entsprechender Bildverarbeitungstechniken ohne weitere Belastung der Versuchstiere quantitativ ausgewertet werden (Pries, 1988; Klyscz et al., 1997).

Der Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen im Rahmen der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie kann phototoxische Effekte im zu untersuchenden Gewebe induzieren und somit die Messungen beeinflussen. Die Entstehung dieser phototoxischen Effekte ist von den photophysikalischen Eigenschaften und der Konzentration der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie der Lichtintensität und der Dauer der Lichtexposition abhängig. Sie werden entweder direkt durch thermische Schädigung des Gewebes oder durch die Bildung von Sauerstoffradikalen verursacht. Diese bilden sich bei Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe (Steinbauer et al., 2000). In Folge kann es zu Vasospasmen (Saetzler et al., 1997), zur Thrombusbildung durch Blutplättchenaktivierung (Rosenblum, 1978; Herrmann, 1983), zu einer verstärkten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (Gawlowski et al., 1989; Saetzler et al., 1997), zur Reduktion der funktionellen Kapillardichte (Friesenecker et al., 1994) und zu Endothelzellschäden mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Povlishock et al., 1983; Reed und Miller, 1988) kommen. Deshalb wurden zur Vermeidung der genannten phototoxischen Effekte in der vorliegenden Arbeit entsprechend nach Steinbauer et al. (2000) eine maximale Beobachtungszeit von 20-30 Minuten pro Versuchstier und eine niedrige Dosierung des Fluoreszenzfarbstoffes 5% FITC-Dextran eingehalten.

## 7.2 Diskussion der Ergebnisse

Für das Einwachsen von Endometriumfragmenten in das umliegende Gewebe und deren Entwicklung in Endometrioseherde ist eine adäquate Blutversorgung essenziell. Die Angiogenese ist daher ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Endometriose. Bei der Angiogenese wird durch Hypoxie des Gewebes der proangiogene Faktor VEGF ausgeschüttet. Dieser induziert die Gefäßsprossung (Shweiki et al., 1992; Mailhos et al., 2001; Gerhardt et al., 2003) und interagiert mit dem Notch-Signalweg, der die Gefäßsprossung auf zellulärer Ebene kontrolliert. Durch Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor 2 kommt es zur Expression von Dll4 und somit zur Selektion von Zellen zu nicht-proliferativen Tip-Zellen (Lobov et al., 2007; Tung et al., 2012), welche die Wachstumsrichtung der sich ausbildenden Gefäßsprossen bestimmen (Gerhardt et al., 2003). An den benachbarten Endothelzellen bindet Dll4 an den Notch1-Rezeptor. Dies

bewirkt eine Differenzierung der Endothelzellen zu proliferativen Stalk-Zellen, welche das Längenwachstum der Gefäßsprossen bewirken (Tung et al., 2012). Die Interaktion zwischen einzelnen Endothelzellen sorgt dadurch für ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Tip- und Stalk-Zellen, sodass es zu einer gerichteten Gefäßsprossung und somit zur Ausbildung eines funktionsfähigen Gefäßnetzwerks kommt (Hellström et al., 2007).

In verschiedenen Tumorstudien konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung des Notch-Signalwegs zu einer vermehrten Bildung von Tip-Zellen und zu ungerichteten Gefäßsprossungen führt (Ridgway et al., 2006; Suchting et al., 2007). Hierdurch kommt es zwar zu einer verbesserten Tumolvaskularisierung mit erhöhter Gefäßdichte, jedoch besteht das neu gebildete Gefäßnetzwerk aus nicht funktionsfähigen Gefäßen. Dies resultiert in einer Verkleinerung der Tumoren (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006; Scehnet et al., 2007; Suchting et al., 2007). Die Stimulation einer ungerichteten Angiogenese durch Hemmung des Notch-Signalwegs stellt somit einen Ansatz zur Tumorthherapie dar (Roca und Adams, 2007) und könnte auch die Entwicklung und das Wachstum von Endometrioseherden hemmen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, wie sich die Hemmung des Notch-Signalwegs auf Endometrioseherde auswirkt und ob dies in Zukunft ein sinnvoller Therapieansatz zur Behandlung der Endometriose sein könnte. Hierbei sollte jedoch bedacht werden, dass die Hemmung des Notch-Signalwegs teratogene Nebenwirkungen induzieren und die Reproduktionsorgane in ihrer physiologischen Funktion beeinträchtigen könnte.

Entsprechend der Ergebnisse von Tumorstudien, die DAPT zur Hemmung des Notch-Signalwegs einsetzten (Paris et al., 2005; Suchting et al., 2007; Vartanian et al., 2013; Zou et al., 2013), zeigten sich in dieser Arbeit ebenfalls mehr Gefäßsprossen in den mit DAPT behandelten Endometrioseherden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die vermehrte Gefäßsprossung wiesen diese Herde im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 6 auch eine höhere Gefäßdichte und größere revaskularisierte Fläche auf. Dies zeigt deutlich, dass der Notch-Signalweg auch an der Regulation der Angiogenese in Endometrioseherden beteiligt ist (Körbel et al., 2018). In Tumorstudien konnte durch die Hemmung des Notch-Signalwegs zusätzlich das Wachstum von Tumoren unterbunden werden (Paris et al., 2005; Zou et al., 2013). Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz dazu in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied im Wachstum der Endometrioseherde zwischen der mit DAPT behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Zum Ende des Beobachtungszeitraums wiesen die Endometrioseherde beider Gruppen eine vergleichbare Größe auf. Ein Einfluss auf die Morphologie der Herde und die proliferative Aktivität der Drüsen und des Stromas konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

An der Vaskularisierung von Endometrioseherden sind neben der Angiogenese noch weitere Prozesse, wie die Inoskulation von Blutgefäßen und die Vaskulogenese, beteiligt (Laschke und Menger, 2018). Die Inoskulation beschreibt die Verbindung einwachsender Gefäße aus der Umgebung mit bereits existierenden Gefäßen in den Transplantaten (Laschke et al., 2009b). Bei der Endometriose entwickeln sich neue Endometrioseherde aus Endometriumfragmenten, die bereits ein eigenes, vollständig entwickeltes Gefäßnetzwerk aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnten diese vorbestehenden Gefäße durch ihr GFP-Signal nachgewiesen werden. Hierfür wurden GFP<sup>+</sup> Endometriumfragmente von transgenen C57BL/6-TgN(ACTB-EGFP)10sb/J Spendermäusen entnommen und in die Rückenhautkammer von DAPT- und Vehikel-behandelten C57BL/6 Wildtypmäusen transplantiert. In den Endometrioseherden beider Gruppen konnte eine vergleichbare Anzahl GFP<sup>+</sup> Gefäße nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich in den DAPT-behandelten Endometrioseherden mehr GFP<sup>-</sup> Gefäße, die aus der Umgebung in die Herde einwachsen. Dies resultierte im Vergleich zur Kontrollgruppe in einer signifikant erhöhten Dichte GFP<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup> Gefäße an Tag 3. Das frühe Einwachsen dieser Gefäße aus der Umgebung ermöglichte eine frühe Anbindung an die vorbestehenden GFP<sup>+</sup> Gefäße in den Endometrioseherden und belegt, dass die Inoskulation tatsächlich wesentlich an der Vaskularisierung von Endometrioseherden beteiligt ist. Durch Inoskulation kommt es zu einer frühen Perfusion des transplantierten Gewebes (Laschke und Menger, 2018). Dies zeigte sich in dieser Arbeit an einer erhöhten Blutperfusion an Tag 6 in der DAPT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Neben der Angiogenese und der Inoskulation ist auch die Vaskulogenese an der Vaskularisierung von Endometrioseherden beteiligt (Laschke und Menger, 2018). Die Vaskulogenese ist charakterisiert durch die Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Die endothelialen Vorläuferzellen werden schließlich als Endothelzellen in die neuen Gefäße der Endometrioseherde eingebaut. Die Mobilisierung erfolgt dabei durch die Hypoxie-induzierte Ausschüttung von VEGF (Becker et al., 2011; Laschke et al., 2011a; Rudzitis-Auth et al., 2016). Laschke et al. (2011a) wiesen nach, dass die Vaskularisierung von Endometrioseherden signifikant gehemmt ist, wenn die Mobilisierung der endothelialen Vorläuferzellen unterbunden wird.

Es ist davon auszugehen, dass sich durch die Vaskulogenese und die Inoskulation auch in der vorliegenden Arbeit funktionsfähige Gefäßnetzwerke in den Endometrioseherden ausbilden konnten. Die Auswirkungen der Hemmung des Notch-Signalwegs konnten somit, anders als in Tumoren, möglicherweise durch diese beiden Mechanismen teilweise kompensiert werden.

Letztendlich muss bedacht werden, dass es sich bei der Endometriose um eine benigne Erkrankung handelt. Entsprechend werden in Endometrioseherden anders als bei unkontrolliertem Tumorwachstum gut entwickelte, stabile Gefäße ausgebildet (Laschke et al., 2006b). Diese dienen dazu, ektopes Endometrium außerhalb der Gebärmutter ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Deshalb war am Ende der Versuchsreihe kein Unterschied in der Gefäßdichte zwischen der DAPT- und der Kontrollgruppe zu beobachten. Alle Herde waren zum Ende des Beobachtungszeitraums vollständig vaskularisiert.

### **7.2.1 Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven**

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Angiogenese in Endometrioseherden durch den Notch-Signalweg reguliert wird. An der Vaskularisierung von Endometrioseherden sind mit hoher Wahrscheinlichkeit jedoch neben der Angiogenese auch Prozesse wie Inoskulation und Vaskulogenese beteiligt. Dies bedeutet, dass es zur Behandlung der Endometriose vermutlich nicht ausreichend ist, nur einen dieser Prozesse zu hemmen. Daher wäre es interessant, in weiteren Studien zu untersuchen, ob die Beeinflussung bzw. die Hemmung aller drei Prozesse einen therapeutischen Effekt auf Endometrioseherde haben könnte. Bei der Entwicklung neuer Therapieansätze sollte jedoch bedacht werden, dass von einer Endometriose vor allem junge Frauen im reproduktiven Alter mit eventuell bestehendem Kinderwunsch betroffen sind. Die Behandlung einer Endometriose sollte daher weder den Reproduktionszyklus beeinflussen noch teratogene Nebenwirkungen hervorrufen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Algire GH** An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1–11, (1943)
2. **Alva JA, Iruela-Arispe ML** Notch signaling in vascular morphogenesis. *Curr Opin Hematol* 11: 278–283, (2004)
3. **Aoki D, Katsuki Y, Shimizu A, Kakinuma C, Nozawa S** Successful heterotransplantation of human endometrium in SCID mice. *Obstet Gynecol* 83: 220–228, (1994)
4. **Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770–776, (1999)
5. **Awwad JT, Sayegh RA, Tao XJ, Hassan T, Awwad ST, Isaacson K** The SCID mouse: an experimental model for endometriosis. *Hum Reprod* 14: 3107–3111, (1999)
6. **Baker M, Wayland H** On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131–143, (1974)
7. **Barten DM, Meredith Jr JE, Zaczek R, Houston JG, Albright CF** Gamma-secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity. *Drugs R D* 7: 87–97, (2006)
8. **Becker CM, Beaudry P, Funakoshi T, Benny O, Zaslavsky A, Zurakowski D, Folkman J, D'Amato RJ, Ryeom S** Circulating endothelial progenitor cells are up-regulated in a mouse model of endometriosis. *Am J Pathol* 178: 1782–1791, (2011)
9. **Becker CM, Wright RD, Satchi-Fainaro R, Funakoshi T, Folkman J, Kung AL, D'Amato RJ** A novel noninvasive model of endometriosis for monitoring the efficacy of antiangiogenic therapy. *Am J Pathol* 168: 2074–2084, (2006)
10. **Beinder E** Gynäkologie und Geburtshilfe: Mit 237 Tabellen, 2., überarb. Aufl. Elsevier, Urban & Fischer, München, (2011)
11. **Benedito R, Roca C, Sörensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, Adams RH** The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124–1135, (2009)
12. **Bray SJ** Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 678–689, (2006)
13. **Brückner K, Perez L, Clausen H, Cohen S** Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406: 411–415, (2000)
14. **Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, Gorstein F, Osteen KG** Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 99: 2851–2857, (1997)
15. **Caligioni CS** Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* Appendix 48: A.4I.1-A.4I.8, (2009)

16. **Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH** Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2: 67–76, (1970)
17. **Chávez-Cartaya RE, Ramirez P, Jamieson NV** Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 27: 82–92, (1995)
18. **Chung MS, Han SJ** Endometriosis-associated angiogenesis and anti-angiogenic therapy for endometriosis. *Front Glob Womens Health* 3: 856316, (2022)
19. **Coleman BG, Arger PH, Mulhern Jr CB** Endometriosis: clinical and ultrasonic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 132: 747–749, (1979)
20. **Conzen PF, Habazettl H, Christ M, Baier H, Hobbhahn J, Vollmar B, Peter K** Left ventricular surface tissue oxygen pressures determined by oxygen sensitive multiwire electrodes in pigs. *Cardiovasc Res* 25: 207–216, (1991)
21. **Conzen PF, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W** Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 69: 643–651, (1988)
22. **Cummings AM, Metcalf JL** Induction of endometriosis in mice: a new model sensitive to estrogen. *Reprod Toxicol* 9: 233–238, (1995)
23. **Dalal SJ, Estep JS, Valentin-Bon IE, Jerse AE** Standardization of the Whitten effect to induce susceptibility to *Neisseria gonorrhoeae* in female mice. *Contemp Top Lab Anim Sci* 40: 13–17, (2001)
24. **D’Assoro AB, Leon-Ferre R, Braune E-B, Lendahl U** Roles of notch signaling in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci* 23: 6241, (2022)
25. **Dèfrere S, Van Langendonck A, González Ramos R, Jouret M, Mettlen M, Donnez J** Quantification of endometriotic lesions in a murine model by fluorimetric and morphometric analyses. *Hum Reprod* 21: 810–817, (2006)
26. **Del Gaudio F, Liu D, Lendahl U** Notch signalling in healthy and diseased vasculature. *Open Biol* 12: 220004, (2022)
27. **D’Hooghe TM, Bambra CS, Cornillie FJ, Isahakia M, Koninckx PR** Prevalence and laparoscopic appearance of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*). *Biol Reprod* 45: 411–416, (1991)
28. **D’Hooghe TM, Bambra CS, de Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR** The prevalence of spontaneous endometriosis in the baboon (*Papio anubis*, *Papio cynocephalus*) increases with the duration of captivity. *Acta Obstet Gynecol Scand* 75: 98–101, (1996)

29. **D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM, de Jonge I, Lauweryns JM, Koninckx PR** Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (*Papio cynocephalus* and *Papio anubis*). *Am J Obstet Gynecol* 173: 125–134, (1995)
30. **D'Hooghe TM, Bambra CS, Suleman MA, Dunselman GA, Evers HL, Koninckx PR** Development of a model of retrograde menstruation in baboons (*Papio anubis*). *Fertil Steril* 62: 635–638, (1994)
31. **Dick Jr EJ, Hubbard GB, Martin LJ, Leland MM** Record review of baboons with histologically confirmed endometriosis in a large established colony. *J Med Primatol* 32: 39–47, (2003)
32. **Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M** Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 13: 1686–1690, (1998)
33. **D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G** The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27: 5148–5167, (2008)
34. **Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J** Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* 27: 5132–5137, (2008)
35. **Edwards AK, Nakamura DS, Virani S, Wessels JM, Tayade C** Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. *J Reprod Immunol* 97: 85–94, (2013)
36. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K** Technical report—a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125–134, (1980)
37. **van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, Cozijnsen M, Robine S, Winton DJ, Radtke F, Clevers H** Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435: 959–963, (2005)
38. **Fainaru O, Adini A, Benny O, Adini I, Short S, Bazinet L, Nakai K, Pravda E, Hornstein MD, D'Amato RJ, Folkman J** Dendritic cells support angiogenesis and promote lesion growth in a murine model of endometriosis. *FASEB J* 22: 522–529, (2008)
39. **Falabella CA, Jiang H, Frame MD, Chen W** In vivo validation of biological responses of bFGF released from microspheres formulated by blending poly-lactide-co-glycolide and poly(ethylene glycol)-grafted-chitosan in hamster cheek pouch microcirculatory models. *J Biomater Sci Polym Ed* 20: 903–922, (2009)
40. **Fazleabas AT, Brudney A, Gurates B, Chai D, Bulun S** A modified baboon model for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 955: 308–17, (2002)
41. **Feng D, Menger MD, Laschke MW** Vascular disrupting effects of combretastatin A4 phosphate on murine endometriotic lesions. *Fertil Steril* 100: 1459–1467, (2013)

42. **Feng D, Menger MD, Wang H, Laschke MW** Luminal epithelium in endometrial fragments affects their vascularization, growth and morphological development into endometriosis-like lesions in mice. *Dis Model Mech* 7: 225–232, (2014)
43. **Fiebig E, Ley K, Arfors KE** Rapid leukocyte accumulation by „spontaneous“ rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp* 10: 127–144, (1991)
44. **Forsman AD, McCormack JT** Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrous cycle. *Anat Rec* 233: 515–520, (1992)
45. **Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M** Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: H2204–H2212, (1994)
46. **Funk W, Endrich B, Messmer K** A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)* 186: 259–270, (1986)
47. **Gambino LS, Wreford NG, Bertram JF, Dockery P, Lederman F, Rogers PAW** Angiogenesis occurs by vessel elongation in proliferative phase human endometrium. *Hum Reprod* 17: 1199–1206, (2002)
48. **Gao X, Yeh Y-C, Outley J, Simon J, Botteman M, Spalding J** Health-related quality of life burden of women with endometriosis: a literature review. *Curr Med Res Opin* 22: 1787–1797, (2006)
49. **Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ** Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 37: 1–15, (1989)
50. **Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C** VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161: 1163–1177, (2003)
51. **Geudens I, Gerhardt H** Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 138: 4569–4583, (2011)
52. **Giudice LC, Kao LC** Endometriosis. *Lancet* 364: 1789–1799, (2004)
53. **Groothuis PG, Nap AW, Winterhager E, Grümmer R** Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 8: 147–156, (2005)
54. **Grümmer R** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 12: 641–649, (2006)
55. **Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA, Olson JM** The SmoA1 mouse model reveals that Notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res* 64: 7794–7800, (2004)

56. **Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM** Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 64: 151–154, (1984)
57. **Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, Ruther W** Femur window—a new approach to microcirculation of living bone in situ. *J Orthop Res* 23: 1073–1082, (2005)
58. **Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K** Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 273: H989–H996, (1997)
59. **Harry JA, Ormiston ML** Novel pathways for targeting tumor angiogenesis in metastatic breast cancer. *Front Oncol* 11: 772305, (2021)
60. **Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson A-K, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C** Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445: 776–780, (2007)
61. **Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ** A study of the pharmacologic control of blood flow to delayed skin flaps using xenon washout. Part II. *Plast Reconstr Surg* 71: 399–407, (1983)
62. **Herrmann KS** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238–249, (1983)
63. **Hirashima M** Regulation of endothelial cell differentiation and arterial specification by VEGF and Notch signaling. *Anat Sci Int* 84: 95–101, (2009)
64. **Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Takemura Y, Morimoto C, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y** Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum Reprod* 20: 2092–2096, (2005)
65. **Hull ML, Prentice A, Wang DY, Butt RP, Phillips SC, Smith SK, Charnock-Jones DS** Nimesulide, a COX-2 inhibitor, does not reduce lesion size or number in a nude mouse model of endometriosis. *Hum Reprod* 20: 350–358, (2005)
66. **Jakobsson AE, Norrby K, Ericson LE** A morphometric method to evaluate angiogenesis kinetics in the rat mesentery. *Int J Exp Pathol* 75: 219–224, (1994)
67. **Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E** Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383: 707–710, (1996)

68. **Kalaitzopoulos DR, Samartzis N, Kolovos GN, Mareti E, Samartzis EP, Eberhard M, Dinas K, Daniilidis A** Treatment of endometriosis: a review with comparison of 8 guidelines. *BMC Womens Health* 21: 397, (2021)
69. **Kaufmann M, Costa SD, Canaris T** Die Gynäkologie, 3., vollständig überarbeitete und erw. Aufl. Springer, Berlin, (2013)
70. **Kaufmann R, Rudolphi A, Boxberger HJ, Hainzl A, Rosenthal H, Reimann J** Stable engraftment of human female genital mucous membrane xenografts on SCID mice. *Gynecol Obstet Invest* 40: 97–100, (1995)
71. **Keller SA, Paxian M, Ashburn JH, Clemens MG, Huynh T** Kupffer cell ablation improves hepatic microcirculation after trauma and sepsis. *J Trauma* 58: 740–749, (2005)
72. **Kennedy DC, Coen B, Wheatley AM, McCullagh KJA** Microvascular experimentation in the chick chorioallantoic membrane as a model for screening angiogenic agents including from gene-modified cells. *Int J Mol Sci* 23: 452, (2021)
73. **Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H** Cap image—a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168–175, (1997)
74. **Kolb EA, Gorlick R, Keir ST, Maris JM, Lock R, Carol H, Kurmasheva RT, Reynolds CP, Kang MH, Wu J, Houghton PJ, Smith MA** Initial testing (stage 1) by the pediatric preclinical testing program of RO4929097, a  $\gamma$ -secretase inhibitor targeting Notch signaling. *Pediatr Blood Cancer* 58: 815–818, (2012)
75. **Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH** Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4: 741–751, (1998)
76. **Kopan R, Ilagan MXG** Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 499–504, (2004)
77. **Kopan R, Ilagan MXG** The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216–233, (2009)
78. **Kopp H-G, Ramos CA, Rafii S** Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol* 13: 175–181, (2006)
79. **Körbel C, Gerstner MD, Menger MD, Laschke MW** Notch signaling controls sprouting angiogenesis of endometriotic lesions. *Angiogenesis* 21: 37–46, (2018)
80. **Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T** Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14: 1343–1352, (2000)

81. **Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE** Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. *J Physiol* 501: 375–386, (1997)
82. **Kume T** Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J Angiogenes Res* 1: 8, (2009)
83. **Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149: 137–144, (2006a)
84. **Laschke MW, Elitzsch A, Vollmar B, Vajkoczy P, Menger MD** 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, (2006b)
85. **Laschke MW, Giebels C, Menger MD** Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update* 17: 628–636, (2011a)
86. **Laschke MW, Giebels C, Nickels RM, Scheuer C, Menger MD** Endothelial progenitor cells contribute to the vascularization of endometriotic lesions. *Am J Pathol* 178: 442–450, (2011b)
87. **Laschke MW, Häufel JM, Scheuer C, Menger MD** Angiogenic and inflammatory host response to surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 91: 497–507, (2009a)
88. **Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD** 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, (2010)
89. **Laschke MW, Menger MD** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 13: 331–342, (2007)
90. **Laschke MW, Menger MD** The dorsal skinfold chamber: A versatile tool for preclinical research in tissue engineering and regenerative medicine. *Eur Cell Mater* 32: 202–215, (2016)
91. **Laschke MW, Menger MD** Basic mechanisms of vascularization in endometriosis and their clinical implications. *Hum Reprod Update* 24: 207–224, (2018)
92. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD** Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455–465, (2009b)
93. **Laschke MW, Vorsterman van Oijen AE, Scheuer C, Menger MD** In vitro and in vivo evaluation of the anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol. *Br J Pharmacol* 163: 835–844, (2011c)

94. **Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD** Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 82: 494–505, (2007)
95. **Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F** The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132: 1751–1762, (2005)
96. **Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN** Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 75: 1–10, (2001)
97. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055–1062, (1993)
98. **Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, McAdow R, Johnson SL, Lewis J** Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* 134: 839–844, (2007)
99. **Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, Sørensen I, Ziegelhoeffer T, Gossler A, Drexler H, Limbourg FP** Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circ Res* 100: 363–371, (2007)
100. **Lipowsky HH, Zweifach BW** Application of the „two-slit“ photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 15: 93–101, (1978)
101. **Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ** Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3219–3224, (2007)
102. **Luistro L, He W, Smith M, Packman K, Vilenchik M, Carvajal D, Roberts J, Cai J, Berkofsky-Fessler W, Hilton H, Linn M, Flohr A, Jakob-Røtne R, Jacobsen H, Glenn K, Heimbrook D, Boylan JF** Preclinical profile of a potent gamma-secretase inhibitor targeting Notch signaling with in vivo efficacy and pharmacodynamic properties. *Cancer Res* 69: 7672–7680, (2009)
103. **Maas JW, Groothuis PG, Dunselman GA, de Goeij AF, Struijker-Boudier HA, Evers JL** Development of endometriosis-like lesions after transplantation of human endometrial fragments onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 16: 627–631, (2001)
104. **Maas JW, Le Noble FA, Dunselman GA, de Goeij AF, Struyker Boudier HA, Evers JL** The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to investigate the angiogenic properties of human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 48: 108–112, (1999)
105. **MacKenzie WF, Casey HW** Animal model of human disease. Endometriosis. Animal model: endometriosis in rhesus monkeys. *Am J Pathol* 80: 341–344, (1975)

106. **Mailhos C, Modlich U, Lewis J, Harris A, Bicknell R, Ish-Horowicz D** Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* 69: 135–144, (2001)
107. **Malik E, Meyhöfer-Malik A, Berg C, Böhm W, Kunzi-Rapp K, Diedrich K, Rück A** Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid. *Hum Reprod* 15: 584–588, (2000)
108. **McLaren J** Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 6: 45–55, (2000)
109. **McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, Smith SK** Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod* 11: 220–223, (1996)
110. **McLaren JS, Morris E, Rymer J** Gonadotrophin receptor hormone analogues in combination with add-back therapy: an update. *Menopause Int* 18: 68–72, (2012)
111. **Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B** Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 41: 823–830, (1996)
112. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83–91, (2002)
113. **Menger MD, Lehr HA** Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519–522, (1993)
114. **Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“. *Am J Physiol* 263: H1901–H1906, (1992)
115. **Menger MD, Vajkoczy P, Beger C, Messmer K** Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 93: 2280–2285, (1994)
116. **Miele L, Osborne B** Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 181: 393–409, (1999)
117. **Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF** Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* 406: 369–375, (2000)
118. **Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN** Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10972–10977, (2000)
119. **Nap AW, Dunselman GAJ, de Goeij AFPM, Evers JLH, Groothuis PG** Inhibiting MMP activity prevents the development of endometriosis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Hum Reprod* 19: 2180–2187, (2004a)

120. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JLH, Dunselman GAJ** Pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 233–244, (2004b)
121. **Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Maas JWM, Dunselman GAJ, de Goeij AFPM, Evers JLH** Tissue integrity is essential for ectopic implantation of human endometrium in the chicken chorioallantoic membrane. *Hum Reprod* 18: 30–34, (2003)
122. **Nenicu A, Körbel C, Gu Y, Menger MD, Laschke MW** Combined blockade of angiotensin II type 1 receptor and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by telmisartan effectively inhibits vascularization and growth of murine endometriosis-like lesions. *Hum Reprod* 29: 1011–1024, (2014)
123. **Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, Jadoul P, Donnez J** Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice. *Hum Reprod* 15: 572–577, (2000)
124. **Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G** Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444: 1032–1037, (2006)
125. **Ochiel DO, Fahey JV, Ghosh M, Haddad SN, Wira CR** Innate immunity in the female reproductive tract: role of sex hormones in regulating uterine epithelial cell protection against pathogens. *Curr Womens Health Rev* 4: 102–117, (2008)
126. **Olivares C, Ricci A, Bilotas M, Barañao RI, Meresman G** The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis. *Fertil Steril* 96: 428–433, (2011)
127. **Olsauskas-Kuprys R, Zlobin A, Osipo C** Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. *Oncotargets Ther* 6: 943–955, (2013)
128. **Oosterlynck DJ, Meuleman C, Sobis H, Vandeputte M, Koninckx PR** Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 59: 778–782, (1993)
129. **Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD** Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387: 908–912, (1997)
130. **Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 18: 311–318, (1979)
131. **Paris D, Quadros A, Patel N, DelleDonne A, Humphrey J, Mullan M** Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 514: 1–15, (2005)
132. **Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 110: 148–160, (1983)

133. **Pries AR** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 327–345, (1988)
134. **Reed MW, Miller FN** Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 36: 104–107, (1988)
135. **Ribatti D, Crivellato E** „Sprouting angiogenesis“, a reappraisal. *Dev Biol* 372: 157–165, (2012)
136. **Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V** Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec* 264: 317–324, (2001)
137. **Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang W-C, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, Singh M, Chien M, Tan C, Hongo J-AS, de Sauvage F, Plowman G, Yan M** Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444: 1083–1087, (2006)
138. **Risau W** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671–674, (1997)
139. **Rizzo P, Osipo C, Foreman K, Golde T, Osborne B, Miele L** Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene* 27: 5124–5131, (2008)
140. **Roca C, Adams RH** Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev* 21: 2511–2524, (2007)
141. **Rosenblum WI** Fluorescence induced in platelet aggregates as a guide to luminal contours in the presence of platelet aggregation. *Microvasc Res* 15: 103–106, (1978)
142. **Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Tavassol F, Mülhaupt R, Gellrich N-C, Menger MD** Vascularization and biocompatibility of scaffolds consisting of different calcium phosphate compounds. *J Biomed Mater Res A* 86: 1002–1011, (2008)
143. **Rudzitis-Auth J, Nenicu A, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW** Estrogen stimulates homing of endothelial progenitor cells to endometriotic lesions. *Am J Pathol* 186: 2129–2142, (2016)
144. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505–513, (1997)
145. **Salamanca A, Beltrán E** Subendometrial contractility in menstrual phase visualized by transvaginal sonography in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 64: 193–195, (1995)
146. **Samon JB, Castillo-Martin M, Hadler M, Ambesi-Impiobato A, Paietta E, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, Jakubczak J, Randolph S, Cordon-Cardo C, Ferrando AA** Preclinical analysis of the  $\gamma$ -secretase inhibitor PF-03084014 in combination with glucocorticoids in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cancer Ther* 11: 1565–1575, (2012)

147. **Sampson JA** Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 3: 93–110, (1927a)
148. **Sampson JA** Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination on endometrial tissues into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 14: 422–469, (1927b)
149. **Sandison JD** A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 28: 281–287, (1924)
150. **Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G** Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp* 5: 73–83, (1986)
151. **Scehnet JS, Jiang W, Kumar SR, Krasnoperov V, Trindade A, Benedito R, Djokovic D, Borges C, Ley EJ, Duarte A, Gill PS** Inhibition of DLL4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood* 109: 4753–4760, (2007)
152. **Scher C, Haudenschild C, Klagsbrun M** The chick chorioallantoic membrane as a model system for the study of tissue invasion by viral transformed cells. *Cell* 8: 373–382, (1976)
153. **Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC** Interactions of leukocytes with vessel walls and with other blood cells, studied by high-resolution intravital videomicroscopy of spleen. *Microvasc Res* 40: 99–117, (1990)
154. **Selkoe D, Kopan R** Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26: 565–597, (2003)
155. **Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK, Charnock-Jones DS** Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 402–409, (2000)
156. **Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN** Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3112–3118, (1996)
157. **Shih I-M, Wang T-L** Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res* 67: 1879–1882, (2007)
158. **Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843–845, (1992)
159. **Silverman NR, Intaglietta M, Simon AL, Tompkins WR** Determination of pulmonary pulsatile perfusion by fluoroscopic videodensitometry. *J Appl Physiol* 33: 147–149, (1972)

160. **Sjölund J, Johansson M, Manna S, Norin C, Pietras A, Beckman S, Nilsson E, Ljungberg B, Axelson H** Suppression of renal cell carcinoma growth by inhibition of Notch signaling in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 118: 217–228, (2008)
161. **Söhngen L, Schmidt M, Wimberger P, Kimmig R, Grümmer R** Additional B-cell deficiency does not affect growth and angiogenesis of ectopic human endometrium in T-cell-deficient endometriosis mouse models during long-term culture. *J Reprod Immunol* 106: 50–57, (2014)
162. **Somigliana E, Viganò P, Rossi G, Carinelli S, Vignali M, Panina-Bordignon P** Endometrial ability to implant in ectopic sites can be prevented by interleukin-12 in a murine model of endometriosis. *Hum Reprod* 14: 2944–2950, (1999)
163. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290–298, (2000)
164. **Story L, Kennedy S** Animal studies in endometriosis: a review. *ILAR J* 45: 132–138, (2004)
165. **Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M** Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer* 110: 117–124, (2004)
166. **de Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R** A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398: 518–522, (1999)
167. **Struthmann L, Hellwig N, Pircher J, Sohn H-Y, Buerkle MA, Klaus V, Mannell H, Pohl U, Krötz F** Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo. *J Thromb Haemost* 7: 1727–1735, (2009)
168. **Suchting S, Freitas C, Le Noble F, Benedito R, Bréant C, Duarte A, Eichmann A** The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3225–3230, (2007)
169. **Talora C, Campese AF, Bellavia D, Felli MP, Vacca A, Gulino A, Screpanti I** Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes. *Biochim Biophys Acta* 1782: 489–497, (2008)
170. **Taylor RN, Yu J, Torres PB, Schickedanz AC, Park JK, Mueller MD, Sidell N** Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis. *Reprod Sci* 16: 140–146, (2009)
171. **Thorlacius H, Lindbom L, Raud J** Cytokine-induced leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles in P-selectin dependent. *Am J Physiol* 272: H1725–H1729, (1997)

172. **Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD** The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* 7: 327–331, (2007)
173. **Tirado-González I, Barrientos G, Tariverdian N, Arck PC, García MG, Klapp BF, Blois SM** Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease. *J Reprod Immunol* 86: 141–147, (2010)
174. **Tung JJ, Tattersall IW, Kitajewski J** Tips, stalks, tubes: Notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006601, (2012)
175. **Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD** Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2: 53–61, (2000)
176. **Vannuccini S, Clemenza S, Rossi M, Petraglia F** Hormonal treatments for endometriosis: the endocrine background. *Rev Endocr Metab Disord* 23: 333–355, (2022)
177. **Vartanian A, Gatsina G, Grigorieva I, Solomko E, Dombrovsky V, Baryshnikov A, Stepanova E** The involvement of Notch signaling in melanoma vasculogenic mimicry. *Clin Exp Med* 13: 201–209, (2013)
178. **Vercellini P, Crosignani PG, Abbiati A, Somigliana E, Viganò P, Fedele L** The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story. *Hum Reprod Update* 15: 177–188, (2009)
179. **Viganò P, Parazzini F, Somigliana E, Vercellini P** Endometriosis: Epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 177–200, (2004)
180. **Villa N, Walker L, Lindsay CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G** Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 108: 161–164, (2001)
181. **Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD** A correlation of intravital microscopically assessed NADH fluorescence, tissue oxygenation, and organ function during shock and resuscitation of the rat liver. *Adv Exp Med Biol* 454: 95–101, (1998)
182. **Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K** Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg* 80: 249–255, (1995)
183. **Wacker A, Gerhardt H** Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol* 23: 676–685, (2011)
184. **Wahl M, Unterberg A, Baethmann A** Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function. *Int J Microcirc Clin Exp* 4: 3–18, (1985)
185. **Webster MH, Patterson J** The photo-electric plethysmograph as a monitor of microvascular anastomoses. *Br J Plast Surg* 29: 182–185, (1976)

186. **Wei P, Walls M, Qiu M, Ding R, Denlinger RH, Wong A, Tsaparikos K, Jani JP, Hosea N, Sands M, Randolph S, Smeal T** Evaluation of selective gamma-secretase inhibitor PF-03084014 for its antitumor efficacy and gastrointestinal safety to guide optimal clinical trial design. *Mol Cancer Ther* 9: 1618–1628, (2010)
187. **Weinmaster G** Notch signal transduction: a real rip and more. *Curr Opin Genet Dev* 10: 363–369, (2000)
188. **Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126: 881–889, (1999)
189. **Weyerstahl T, Stauber M** Gynäkologie und Geburtshilfe, 4., vollst. überarb. Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart, (2013)
190. **Winet H** A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 37: 105–114, (1989)
191. **Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee H-JJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM** Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *J Biol Chem* 279: 12876–12882, (2004)
192. **Xu H, Lui WT, Chu CY, Ng PS, Wang CC, Rogers MS** Anti-angiogenic effects of green tea catechin on an experimental endometriosis mouse model. *Hum Reprod* 24: 608–618, (2009)
193. **Yamauchi JI, Vollmar B, Wolf B, Menger MD** Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg* 16: 400–406, (1999)
194. **Yang JZ, Agarwal SK, Foster WG** Subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates the pathophysiology of endometriosis in the cynomolgus monkey. *Toxicol Sci* 56: 374–381, (2000)
195. **Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, Chu Q** Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 7: 95, (2022)
196. **Zito G, Luppi S, Giolo E, Martinelli M, Venturin I, Di Lorenzo G, Ricci G** Medical treatments for endometriosis-associated pelvic pain. *Biomed Res Int* 2014: 191967, (2014)
197. **Zou Y, Cao Y, Yue Z, Liu J** Gamma-secretase inhibitor DAPT suppresses glioblastoma growth via uncoupling of tumor vessel density from vessel function. *Clin Exp Med* 13: 271–278, (2013)

198. **Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K** Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med (Berl)* 191: 47–63, (1991)

## **9. Danksagung**

Zum Schluss möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Michael D. Menger und Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke. Sie gaben mir die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchzuführen. Außerdem danke ich Ihnen für das Überlassen des Themas.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. med. vet. Christina Körbel für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und bei der Auswertung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Sandra Hans und Janine Becker für die Anfertigung der histologischen Präparate bedanken.

Besonders danke ich meinen Eltern, die mich in meinem Werdegang immer gefördert und mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben. Auch meinem Mann möchte ich für seine Unterstützung danken.

## 10. Publikation

Körbel C, **Gerstner MD**, Menger MD, Laschke MW Notch signaling controls sprouting angiogenesis of endometriotic lesions. *Angiogenesis* 21: 37–46, (2018)

## **11. Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.