

Aus der Klinik für Gynäkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung peritonealer Schmerzmechanismen:
Peritoneale Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarial-
karzinom im Vergleich

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clara Rosa Paula Börner

aus Gotha

Datum der Promotion: 02.03.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
Abstract – Deutsch	XIII
Abstract – English	XV
1 <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1 Das Peritoneum	1
1.2 Endometriose	4
1.2.1 Peritoneale Endometriose	6
1.2.2 Mechanismen der Schmerzpathogenese der Endometriose	6
1.2.2.1 Chronische Entzündung in Endometriose	7
1.2.2.2 Bedeutung von Östrogen in der Pathogenese der Endometriose	8
1.2.2.3 Nervenfasern in Endometriose	9
1.2.2.4 Neurotrophine in Endometriose	10
1.2.2.5 Zusammenfassung der zum Schmerz führenden Mechanismen	11
1.3 Ovarialkarzinom	12
1.3.1 Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	13
1.3.2 Mechanismen der Schmerzpathogenese der Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom	13
1.4 Fragestellung	14
2 <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
2.1 Material	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Substanzen und Chemikalien	19
2.1.4 Antikörper	21
2.1.4.1 Immunhistochemie	21
2.1.4.2 Western Blot	21
2.1.5 Lösungen	22

2.1.5.1	Immunhistochemie	22
2.1.5.1.1	Puffer	22
2.1.5.2	Western Blot	22
2.1.5.2.1	Polyacrylamidgele	22
2.1.5.2.2	Puffer	23
2.1.5.2.3	Entwicklerlösung	23
2.1.6	Software	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Auswahl des Patientinnenkollektivs	24
2.2.1.1	Patientinnen für die Immunhistochemische Analyse	26
2.2.1.2	Patientinnen für die Western Blot-Analyse	27
2.2.1.3	Patientinnen für die Bestimmung von Östrogen	28
2.2.1.4	Patientinnen für den neuronalen Wachstums-Assay	29
2.2.2	Probenmaterialgewinnung	30
2.2.2.1	Peritoneal- und Aszitesflüssigkeit	30
2.2.2.2	Gewebe	30
2.2.3	Immunhistochemie	30
2.2.3.1	Durchführung	30
2.2.3.2	Immunhistochemische Auswertung	32
2.2.4	Proteinbiochemische Analysen	33
2.2.4.1	Bestimmung des Proteingehalts in Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten	33
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.4.3	Western Blot	34
2.2.4.4	Immundetektion	34
2.2.4.5	Auswertung des Western Blot	35
2.2.5	Östrogenbestimmung in Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten	35
2.2.6	Neuronaler Wachstums-Assay	35
2.2.6.1	Präparation der Hühnerembryo-Spinalganglien	35
2.2.6.2	Durchführung des Versuchs	36
2.2.6.3	Auswertung des neuronalen Wachstums-Assays	36
2.2.7	Statistische Auswertung	36

3	ERGEBNISSE	38
3.1	Bestimmung der Nervenfaserdichte und Charakterisierung der Nervenfasern	38
3.1.1	Bestimmung der Nervenfaserdichte in peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	38
3.1.1.1	Bestimmung der NF-Dichte in der nahen Umgebung	38
3.1.1.2	Bestimmung der NF-Dichte in der Peripherie	38
3.1.1.3	Gegenüberstellung der NF-Dichte der nahen Umgebung und der Peripherie	39
3.1.2	Beurteilung sensibler Nervenfasern in peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	41
3.1.2.1	Beurteilung der sensiblen NF-Dichte in der nahen Umgebung	41
3.1.2.2	Beurteilung der sensiblen NF-Dichte in der Peripherie	41
3.1.2.3	Gegenüberstellung der sensiblen NF-Dichte der nahen Umgebung und der Peripherie	41
3.2	Nachweis von Neurotrophinen	44
3.2.1	Vorkommen der Neurotrophine im Gewebe der peritonealen Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	44
3.2.1.1	Vorkommen von NGF	44
3.2.1.1.1	NGF-Expression in peritonealer Endometriose	44
3.2.1.1.2	NGF-Expression in Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom	44
3.2.1.1.3	Vergleich der NGF-Expression in peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom	45
3.2.1.2	Vorkommen von NT-3	48
3.2.1.2.1	NT-3-Expression in peritonealer Endometriose	48
3.2.1.2.2	NT-3-Expression in Peritonealkarzinosen bei Ovarialkarzinom	48
3.2.1.2.3	Vergleich der NT-3-Expression in peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom	48
3.2.1.3	Vorkommen von BDNF	51
3.2.1.3.1	BDNF-Expression in peritonealer Endometriose	51
3.2.1.3.2	BDNF-Expression in Peritonealkarzinosen bei Ovarialkarzinom	51
3.2.1.3.3	Vergleich der BDNF-Expression in peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom	51

3.2.2	Vorkommen der Neurotrophine in Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten bei peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	54
3.3	Bestimmung der Östrogenkonzentration in Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten bei peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	57
3.4	Beurteilung neurotropher Eigenschaften von Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten bei peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms	58
4	<u>DISKUSSION</u>	60
4.1	Innervation	61
4.2	Neurotrophine	62
4.3	Neurotrophe Eigenschaften	66
4.4	Einfluss von Östrogen	67
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	69
	Literaturverzeichnis	71
	Eidesstattliche Versicherung	79
	Lebenslauf	80
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	81
	Danksagung	83

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische und bildliche Darstellung des gesunden Peritoneums. _____ 3
- Abbildung 2: Bildliche Darstellung einer peritonealen Endometrioseläsion. _____ 5
- Abbildung 3: Grafische Darstellung der Nervenfaserdichte PGP9.5-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 39
- Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Nervenfaserdichte PGP9.5-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 40
- Abbildung 5: Grafische Darstellung der Nervenfaserdichte SP-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 42
- Abbildung 6: Bildliche Darstellung der Nervenfaserdichte SP-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 43
- Abbildung 7: Grafische Darstellung der mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores bestimmten NGF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 46
- Abbildung 8: Bildliche Darstellung der NGF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 47
- Abbildung 9: Grafische Darstellung der mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores bestimmten NT-3-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer

-
- Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 49
- Abbildung 10: Bildliche Darstellung der NT-3-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 50
- Abbildung 11: Grafische Darstellung der mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores bestimmten BDNF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 52
- Abbildung 12: Bildliche Darstellung der BDNF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG). _____ 53
- Abbildung 13: Grafische Darstellung der relativen Konzentrationen der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). _____ 55
- Abbildung 14: Exemplarische bildliche Darstellung der Western Blot-Banden der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF sowie des Beta-Aktin in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). _____ 56
- Abbildung 15: Grafische Darstellung der Östrogenkonzentrationen in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). _____ 57
- Abbildung 16: Grafische Darstellung der mithilfe des NWS beurteilten Neuritenaussprossung sensibler Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM),

mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). _____ 58

Abbildung 17: Exemplarische bildliche Darstellung der Neuritenaussprossung aus sensiblen Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrolle (KG). __ 59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für die IHC-Analyse. _____	26
Tabelle 2: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für die WB-Analyse. _____	27
Tabelle 3: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für die Bestimmung von Östrogen. _____	28
Tabelle 4: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für den NWA. _____	29
Tabelle 5: Zusammenstellung der Protokolle für die Immunhistochemie. _____	32
Tabelle 6: Zusammenfassung der relativen Konzentrationen der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). _____	54
Tabelle 7: Zusammenfassung der mithilfe des NWS beurteilten Neuritenaus- sprossung sensibler Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). _____	59

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Aszitesflüssigkeit
APS	Ammoniumpersulfat
Aquadest	destilliertes Wasser
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA-125	Cancer-Antigen 125
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Endometriose
ER α	<i>Estrogen receptor α</i>
ER β	<i>Estrogen receptor β</i>
FIGO	<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>
GAP-43	<i>Growth Associated Protein</i>
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Inc.	<i>Incorporation</i>
IHC	Immunhistochemie

kDa	Kilodalton
KG	Kontrollgruppe
LSAB	<i>Labelled-Strept-Avidin-Biotin</i>
M	Molare Masse
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation -7</i>
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mo.	Monat
Mol	Einheit der Stoffmenge
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NGFRp75	<i>Nerve Growth Factor Receptor / p75</i>
NF	Nervenfaser
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NT-3	Neurotrophin 3
NWA	Neuronales Wachstums-Assay
NWS	Nervenwachstumsscore
OC	Ovarialkarzinom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pEM	Peritoneale Endometriose
PF	Peritonealflüssigkeit
PGE2	Prostaglandin E2
PGP9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PK	Positivkontrolle
pOC	Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom
rASRM	<i>Revised American Society for Reproductive Medicine</i>

rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	<i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SP	Substanz P
Tab.	Tabelle
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trk A/B/C	Tyrosinkinase-Rezeptor A/B/C
U/ml	Units pro Milliliter
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/o	<i>without</i>
WB	<i>Western Blot</i>

Abstract – Deutsch

Einleitung

Die peritoneale Endometriose (pEM) und die Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms (pOC) sind gynäkologische Erkrankungen, die das Peritoneum betreffen. Endometriose präsentiert sich klinisch mit Schmerzen, wobei keine Korrelation von Schmerzintensität und peritonealer Ausbreitung der Erkrankung gesehen werden kann. Patientinnen mit pOC hingegen geben trotz ausgedehntem peritonealem Befall zumeist nur unspezifische Beschwerden an. Als Ursache für die Schmerzentstehung in pEM wird derzeit ein komplexes Zusammenspiel von nervalen, inflammatorischen und hormonellen Faktoren angenommen. In dieser Arbeit wurden mögliche schmerzpathogenetische Mechanismen beider Erkrankungen vergleichend untersucht.

Methoden

Gewebeproben von Patientinnen mit pEM (n=18), pOC (n=15) sowie gesunde Peritoneen als Kontrollgruppe (KG, n=15) wurden intraoperativ entnommen. Die Gesamtdichte von Nervenfasern wurde in immunhistochemischen Färbungen gegen *Protein Gene Product 9.5* (PGP9.5) beurteilt, die sensible Nervenfaserdichte in Färbungen gegen Substanz P (SP). Zudem wurde die Expression der Neurotrophine *Nerve Growth Factor* (NGF), Neurotrophin-3 (NT-3) und *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) im Gewebe bestimmt. Weiterhin wurden Peritoneal- (PF) und Aszitesflüssigkeiten (AF) von Patientinnen mit pEM (n=23), pOC (n=25) sowie Patientinnen mit Uterus myomatosus als KG (n=20) entnommen. Mittels Western Blot wurde die Expression der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF in den PF/AF bestimmt und mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay die Östrogenkonzentration ermittelt. In einem neuronalen Wachstums-Assay wurde die Neuritenaussprossung sensibler Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF/AF untersucht.

Ergebnisse

Es konnten signifikant mehr PGP9.5-positive und SP-positive Nervenfasern in pEM gesehen werden im Gegensatz zur pOC. In den Gewebeproben zeigten sich NGF und BDNF sowohl in pEM als auch pOC signifikant erhöht exprimiert im Vergleich zur

KG. Für NT-3 konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. In den PF/AF konnten NGF, NT-3 und BDNF in allen drei Gruppen nachgewiesen werden, jedoch wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede gesehen. Östrogen konnte in signifikant höherer Konzentration in pEM im Vergleich zur pOC ermittelt werden. Ein Aussprossen von Neuriten aus den in PF/AF inkubierten sensiblen Hühnerembryoganglien war vergleichbar ausgeprägt in pEM und pOC.

Schlussfolgerung

Die Nervenfaserdichte ist in pEM signifikant höher als in pOC. Diese Beobachtung passt zu den divergenten Schmerzbildern beider Erkrankungen und es ist damit denkbar, dass Nervenfasern an der Schmerzentstehung in pEM beteiligt sind. Das Aussprossen sensibler Ganglien inkubiert in PF von pEM und AF von pOC lässt neuromodulatorische Eigenschaften dieser Flüssigkeiten erkennen. Während Neurotrophine und Östrogen in pOC keinen Einfluss auf das Nervenfaserverwachstum zu haben scheinen, könnten diese in pEM die erhöhte Innervation und die ausgeprägte Schmerzklinik erklären.

Abstract – English

Introduction

Peritoneal endometriosis (pEM) and peritoneal carcinomatosis in ovarian cancer (pOC) are gynecological diseases affecting the peritoneum. Endometriosis commonly presents with pain, but no correlation is seen between intensity of pain and peritoneal extent of the disease. Whereas patients with pOC just report on unspecific complains even with extended peritoneal spread. Currently, the origin of pain in pEM is assumed to arise from interaction of neural, inflammatory and hormonal factors. In this study, the possible mechanisms of pain genesis of both diseases were investigated by comparison.

Methods

Tissue samples of patients with pEM (n=18), pOC (n=15) and healthy peritonea as controls (KG, n=15) were collected during surgery. The total nerve fiber density was assessed by immunohistochemical stainings against *Protein Gene Product 9.5* (PGP9.5), the sensory nerve fiber density by stainings against *Substance P* (SP). In addition, the expression of the neurotrophins *Nerve Growth Factor* (NGF), *Neurotrophin-3* (NT-3) and *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) was determined in tissue samples by immunohistochemistry. Furthermore, peritoneal (PF) and ascites fluids (AF) were collected of patients with pEM (n=23), pOC (n=25) and patients with uterine fibroids as controls (n=20). By Western Blot analysis the expression of neurotrophins in PF/AF was evaluated. The estrogen concentration in PF/AF was specified using the electrochemiluminescence immunoassay. A neuronal growth assay was carried out to estimate neurite outgrowth of chicken sensory ganglia incubated in PF/AF.

Results

Significantly more PGP9.5-positive and SP-positive nerve fibers were seen in pEM in contrast to pOC. In tissue samples, NGF and BDNF showed to be significantly higher expressed in pEM and pOC in comparison to controls. For NT-3, no differences could be observed between the groups. Moreover, NGF, NT-3 and BDNF were determined in PF/AF, but no significant differences in concentration were seen. The estrogen

concentration was significantly higher in pEM compared to pOC. The neurite outgrowth of sensory chick ganglia incubated in PF/AF was comparable in pEM and pOC.

Conclusion

Nerve fiber density in pEM is significantly elevated in contrast to pOC. That observation fits to the diverging pain experiences of both diseases and therefore it is conceivable that nerve fibers participate in genesis of pain in pEM. The outgrowth of sensory ganglia incubated in PF of pEM and AF of pOC indicates neuromodulatory characteristics of these fluids. While neurotrophins and estrogen do not seem to influence nerve fiber outgrowth in pOC, they could explain the elevated innervation and distinct pain symptoms in pEM.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Peritoneum

Das Peritoneum ist die größte seröse Membran des menschlichen Körpers und kleidet die Peritonealhöhle aus. Dabei gliedert sich das Peritoneum in ein parietales Blatt, das der äußeren Bauchwand von innen anliegt, und ein viszerales Blatt, das die inneren Organe als äußerste Schicht umgibt.

Das parietale Peritoneum wird somatisch innerviert. Der somatische Schmerz ist typischerweise lokal umschrieben, spitz, dauerhaft präsent und von Lage und Bewegung abhängig. Das viszerale Peritoneum ist durch viszerale sensorische Afferenzen innerviert, welche gemeinsam mit autonomen Nerven verlaufen. Viszerale Schmerzen sind diffus, bohrend, treten zumeist intermittierend auf und gehen mit vegetativen Symptomen wie Unruhe, Übelkeit und Schwitzen einher.

Erkrankungen des Peritoneums können mit verschiedenartigen Schmerzen einhergehen. Akute und starke Schmerzen etwa ruft eine Peritonitis bei akut perforierter Appendizitis hervor. Neoplasien des Peritoneums hingegen verursachen zumeist kaum oder wenig spezifische Schmerzen.

Histologisch baut sich das Peritoneum aus dem einschichtigen plattenepithelialen Mesothel auf, das einer Basallamina aufliegt. Darunter befindet sich die bindegewebige Lamina propria serosae, die Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven führt. Über Organen, die aufgrund unterschiedlicher Füllstände ihre Größe anpassen müssen, findet sich zudem als unterste Schicht des Peritoneums die Tela subserosa, eine bindegewebige Verschiebeschicht [1, 2]. Die Mesothelzellen werden von Desmosomen zusammengehalten, Tight Junctions zwischen den Zellen regulieren den parazellulären Flüssigkeitstransport durch das Mesothel [3] (s. Abbildung 1).

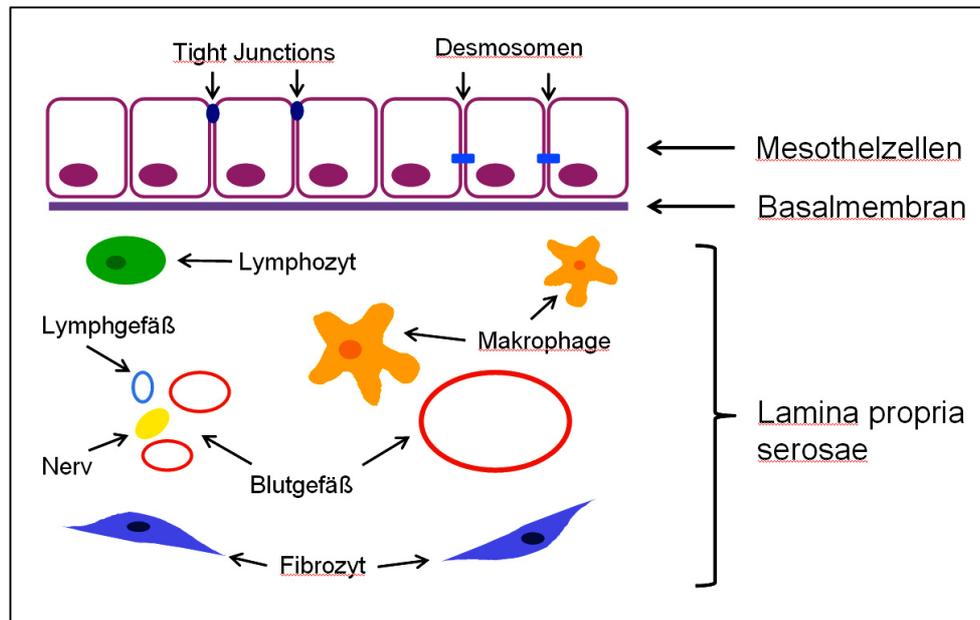
Das Peritoneum produziert eine visköse Flüssigkeit, welche zwischen dem parietalen und dem viszeralen Blatt des Peritoneums die Reibung dieser aneinander reduziert. Diese sogenannte Peritonealflüssigkeit tritt als Transsudat aus den in der Lamina propria serosae befindlichen Gefäßen aus und gelangt über das Mesothel in die Peritonealhöhle. Physiologisch ist eine intraperitoneale Flüssigkeitsmenge von wenigen Millilitern bei Frauen und noch einmal deutlich weniger bei Männern [4, 5]. Diese zirkuliert durch die Peritonealhöhle, angetrieben durch die wechselnden intraabdominellen Drücke im Atemzyklus [6]. Die Peritonealflüssigkeit enthält neben Wasser, Elektrolyten, Proteinen

und gelösten Stoffen auch Zellen. So konnten Mesothelzellen und Fibroblasten, aber auch Immunzellen nachgewiesen werden [1, 7]. Die Reabsorption der Peritonealflüssigkeit und ihrer Bestandteile erfolgt vorrangig über die Lymphgefäße des Peritoneums, wobei der Großteil über das am Zwerchfell gelegene Peritoneum wieder aufgenommen wird. Vereinfacht wird dieser Prozess durch peritoneale Spaltöffnungen, die Peritonealhöhle und Lymphgefäß näher zueinander bringen [8].

Das Peritoneum dient darüber hinaus auch als physikalische Barriere und schützt die umliegenden Organe vor schädlichen Einflüssen sowie Erregern aus der Peritonealhöhle. In der Lamina propria serosae befinden sich zudem Zellen des retikuloendothelialen Systems wie Makrophagen und Zellen der spezifischen Abwehr wie T-Lymphozyten. Sie sind linear unterhalb des Mesothels sowie um die Blutgefäße angeordnet [9]. Zusammen mit den frei in der Peritonealflüssigkeit vorliegenden Immunzellen rufen sie im Falle einer Fremdeinwirkung eine abwehrende Immunreaktion im Peritoneum hervor.

Die Pathologien des Peritoneums können vielfältige Ursachen haben. In der Gynäkologie sind zwei Erkrankungen des Peritoneums von Bedeutung: die Endometriose und das Ovarialkarzinom. Gehen diese beiden Erkrankungen mit einem Befall des Peritoneums einher, so wird von ihnen als peritoneale Endometriose bzw. Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom gesprochen. Neben der gemeinsamen Lokalisation im Peritoneum unterscheiden sich diese Erkrankungen wesentlich in ihrer klinischen Präsentation und dem Auftreten von Schmerzen.

A



B

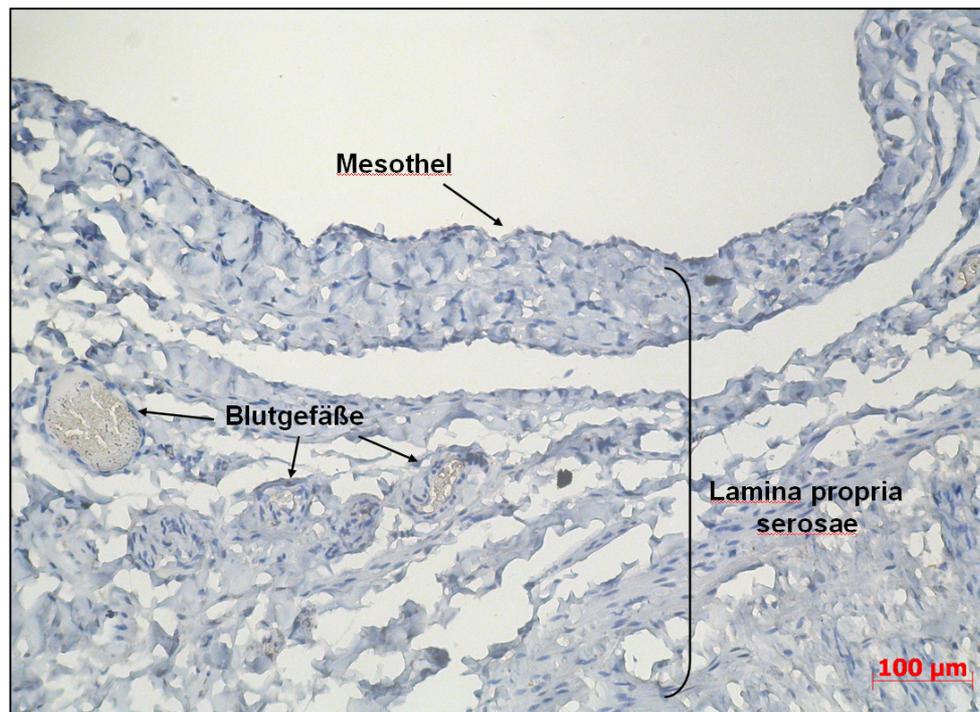


Abbildung 1: Schematische und bildliche Darstellung des gesunden Peritoneums.

(A) Schematische Darstellung von Mesothelzellen, Basalmembran und Lamina propria serosae mit den dort befindlichen Zellen und Strukturen. (B) Bildliche Darstellung von Mesothel und Lamina propria serosae mit den dort befindlichen Blutgefäßen. Aufnahme des Bildes in 200facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt.

1.2 Endometriose

Endometriose ist eine gutartige Östrogen-abhängige Erkrankung, bei der sich Endometrium-artiges Gewebe außerhalb des Cavum uteri findet. Sie nimmt häufig einen chronischen Verlauf, wobei entzündliche Prozesse von Bedeutung sind. Circa 10% der Frauen im reproduktiven Alter sind betroffen [10]. Aufgrund der aufwendigen Diagnostik zur definitiven Diagnosestellung muss aber von einer weit höheren Prävalenz ausgegangen werden.

Die Ätiologie der Endometriose ist bislang ungeklärt. Verschiedene Theorien liefern Erklärungsversuche. Am weitesten verbreitet ist die Transplantationstheorie nach Sampson, bei der eine retrograde Menstruation über die Tube mit anschließender Verstreuerung von Endometriumzellen über die Bauchhöhle und Implantation an anderer Stelle angenommen wird [11]. Allerdings kann keine Theorie für sich allein die Erkrankung in ihrer Gesamtheit begründen.

Klinisch manifestiert sich eine Endometriose typischerweise durch Schmerzen wie Dysmenorrhö, Dyspareunie, Dyschezie, Dysurie und Unterbauchschmerzen, wobei diese Schmerzen interindividuell sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können. Zudem kann die Erkrankung im Rahmen einer Fertilitätsstörung auffallen [12]. Diese Symptome können die Lebensqualität der Patientinnen erheblich beeinträchtigen. Aber auch asymptomatische Zufallsbefunde sind nicht selten.

Die Diagnose kann nur operativ gestellt werden und wird im Idealfall durch eine histologische Aufarbeitung entnommener Endometrioseläsionen gesichert. Eine Endometrioseläsion besteht histologisch aus Drüsenepithel umgeben von Stromazellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen (s. Abbildung 2).

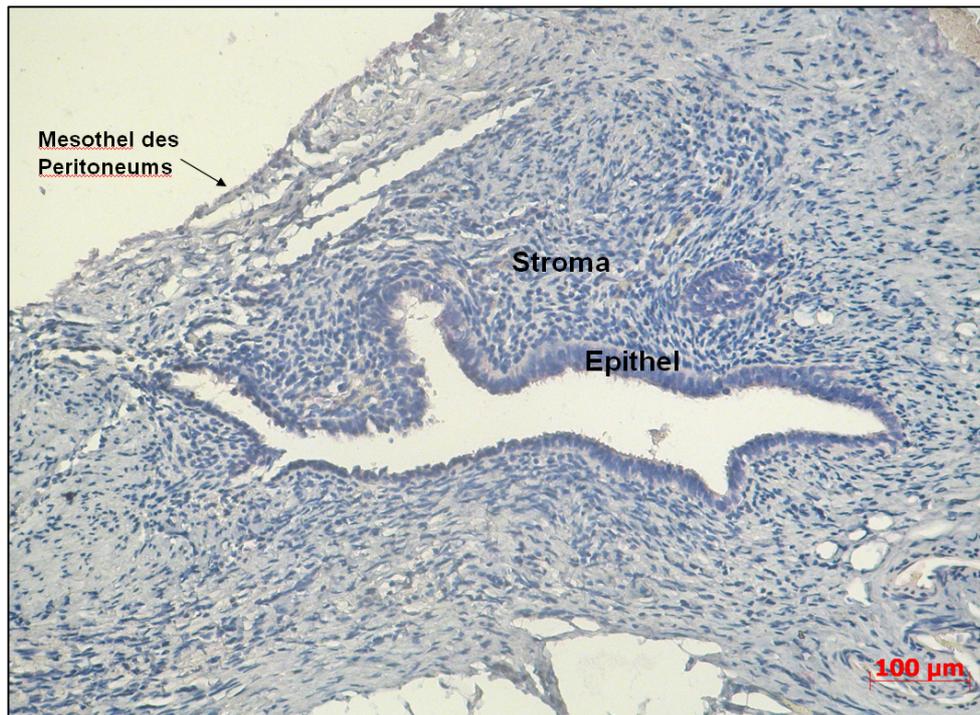


Abbildung 2: Bildliche Darstellung einer peritonealen Endometrioselesion.

Darstellung vom Mesothel des Peritoneums sowie von Epithel und Stroma der Endometrioselesion. Aufnahme des Bildes in 200facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt.

Je nach Lokalisation werden drei Formen unterschieden: Endometriosis genitalis interna (Adenomyose) bezeichnet Endometriose im Myometrium des Uterus, Endometriosis genitalis externa umfasst alle Endometrioseherde der Genitalorgane im kleinen Becken. Infiltrative Herde der Blase oder des Darms sowie Läsionen außerhalb des kleinen Beckens werden als Endometriosis extragenitalis zusammengefasst. Tief infiltrierende Herde werden mittels ENZIAN-Klassifikation eingeteilt [13]. Für die Endometriosis genitalis externa gibt es die international anerkannte Klassifikation der 'American Society of Reproductive Medicine', in der die Endometriose je nach Ausdehnung in vier rASRM-Stadien eingeteilt wird [14].

Therapeutisches Ziel ist es die Symptomatik zu verbessern sowie das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Dazu werden chirurgische und medikamentöse Ansätze verfolgt. Es muss individuell abgewogen werden, ob eine chirurgische Intervention mit möglichst vollständiger Entfernung aller Endometrioselesionen notwendig ist und den Nutzen einer rein medikamentösen Therapie übersteigt. Auch die hohen Rezidivraten nach Operation müssen in die Entscheidungsfindung einbezogen werden [15]. Dieses Risiko kann jedoch durch orale Kontrazeptiva reduziert werden [16]. Medikamentös wird in erster Linie versucht hormonelle Situationen zu simulieren, in denen der Zyklus und

die Menstruation unterdrückt werden. So kommen kombinierte orale Kontrazeptiva, Progestine, GnRH-Analoga und Testosteronderivate zur Anwendung [17]. Hierbei sind in erster Linie die Nebenwirkungen limitierend. Zur Schmerzreduktion kommen zusätzlich nichtsteroidale Antirheumatika zum Einsatz, deren Wirksamkeit allerdings unzureichend belegt ist [18].

Endometriose verursacht hohe Kosten und belastet so die Gesellschaft. Die Kosten setzen sich zusammen aus den direkten Ausgaben für Diagnostik und Therapie der Erkrankung und den indirekten Ausgaben, die beispielsweise hinsichtlich reduzierter Lebensqualität und Arbeitsausfällen entstehen [19].

1.2.1 Peritoneale Endometriose

Das peritoneale Auftreten von Endometriose kann als Endometriosis genitalis externa eingeordnet werden. Am häufigsten findet sich die peritoneale Endometriose im Bereich des kleinen Beckens, insbesondere im Douglas-Raum zwischen Uterus und Rektum [20]. Das Peritoneum des kleinen Beckens ist Teil des parietalen Blattes und somit sensibel innerviert.

Ausgehend von Sampsons Theorie der retrograden Menstruation wird angenommen, dass sich die in die Peritonealhöhle gelangten Endometriumzellen im Peritoneum ansiedeln [11]. Dazu müssen die Zellen in die Peritonealhöhle einwandern, an das Peritoneum binden und im Peritoneum ansässig werden, um dort ihr Überleben zu sichern. Der Ablauf dieser Etablierung von Endometriosezellen im Peritoneum konnte bislang nicht zusammenhängend aufgezeigt werden. Verschiedene Mechanismen scheinen im Prozess beteiligt zu sein, wobei vermutlich sowohl Veränderungen an den Mesothelzellen als auch Veränderungen an den ektopen Endometriumzellen von Bedeutung sind.

1.2.2 Mechanismen der Schmerzpathogenese der Endometriose

Hat sich die Endometriose im Gewebe etabliert, so verursacht sie oftmals Schmerzen. Insbesondere geben Frauen mit Endometriose zyklusabhängige oder chronische Dysmenorrhö und Unterbauchschmerzen an. Zudem liegt häufig eine Kombination von verschiedenen Schmerzsymptomen vor [21]. Paradoxe Weise lässt sich kein Zusammenhang sehen zwischen der Schmerzintensität und dem Ausmaß der Endometriose [22,

23]. Auch wenige und kleine Endometrioseherde können ausgeprägte Schmerzen verursachen.

Die Pathogenese der Schmerzen in Endometriose ist in ihrer Gesamtheit bislang ungeklärt. Es konnten verschiedene Faktoren ausgemacht werden, von denen ein Einfluss auf die Entstehung des Schmerzes bei Endometriose angenommen wird. Als bedeutende Faktoren werden insbesondere Entzündungsprozesse, Steroidhormone wie Östrogen, Nervenfasern sowie Neurotrophine angesehen.

1.2.2.1 Chronische Entzündung in Endometriose

Peritoneale Endometrioseläsionen gehen mit Entzündungsprozessen einher. So konnten vermehrt Immunzellen, aber auch proinflammatorische Mediatoren in der Umgebung von Endometrioseläsionen gefunden werden.

Hierbei wird den Makrophagen ein wesentlicher Beitrag zugesprochen. Makrophagen konnten verschiedentlich sowohl im Gewebe um Endometrioseläsionen, als auch in den Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose in gesteigerter Zahl und vermehrt aktiviert im Vergleich zu gesunden Frauen ohne Endometriose nachgewiesen werden [24-28].

Makrophagen in aktivierter Form sezernieren als ein Bestandteil des zellulären Immunsystems Immunmediatoren und rufen eine Entzündung hervor. Denkbarerweise unterhält diese Entzündungsreaktion die Endometrioseläsion. Zum anderen sezernieren auch peritoneale Endometrioseläsionen selbst proinflammatorische Mediatoren, die sich dann ebenso in der vom Peritoneum gebildeten Peritonealflüssigkeit wiederfinden. In den Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose konnten im Vergleich zu gesunden Frauen veränderte Mengen einer Reihe von Immunmediatoren festgestellt werden [29-34]. Einige dieser Mediatoren locken wiederum chemotaktisch Immunzellen wie Makrophagen an. Für diese sich gegenseitig stimulierenden Mechanismen wird ein wesentlicher Beitrag zur Aufrechterhaltung der Erkrankung mit chronischem Verlauf angenommen.

Zudem gibt es Hinweise, dass über proinflammatorische Mediatoren freie Endigungen sensorischer Nervenfasern aktiviert und sensitiviert werden [35-37]. In entzündetem Gewebe findet sich zudem vermehrt das Neurotrophin *Nerve Growth Factor* (NGF). Es wird davon ausgegangen, dass NGF über Neuropeptide wie Substanz P (SP) ebenfalls sensorische Nervenfasern aktiviert [38, 39]. Ferner ist NGF wiederum an Entzündungs-

reaktionen beteiligt [40, 41]. So könnten die Entzündungsprozesse in Endometriose auch zur Schmerzentstehung der Erkrankung und zum chronischen Schmerzsyndrom beitragen.

1.2.2.2 Bedeutung von Östrogen in der Pathogenese der Endometriose

Hormone spielen im Zusammenhang mit Endometriose eine zentrale Rolle, allen voran das Östrogen. Es ist allgemein bekannt, dass das Endometrium Östrogen-sensibel ist und Östrogen über seine Rezeptoren die Proliferation des Endometriums stimuliert [42-44]. Gleichmaßen nimmt Östrogen Einfluss auf Endometriosezellen [45]. Einige klinische Aspekte untermauern diesen Einfluss von Östrogen auf Endometriose. So wird Endometriose im Wesentlichen bei Frauen im reproduktiven Alter diagnostiziert, also in der Phase der ovulatorischen Zyklen mit Produktion von Östrogen im Ovar [46]. Dies spiegelt auch das klinisch überwiegend zyklische Beschwerdemuster der Erkrankung wieder. Zudem wirkt sich eine geringere Zahl an ovulatorischen Zyklen günstig aus. Multiparität senkt das Risiko an einer Endometriose zu erkranken und auch die hormonelle Endometriose-therapie zielt mit dem Unterbinden ovulatorischer Zyklen auf eine Senkung des Östrogenspiegels ab [17, 47].

Östrogen aber wird bei an Endometriose erkrankten Patientinnen nicht nur im Ovar gebildet, sondern auch von der Endometrioseläsion selbst über das Enzym Aromatase, welches in Endometriose verstärkt exprimiert wird [48, 49]. Die Synthese von Aromatase wird über Prostaglandin E₂ (PGE₂) stimuliert und PGE₂ wiederum wird mithilfe des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2) gebildet [50-52]. Sowohl PGE₂ als auch COX-2 liegen in ektopen Endometrioseläsionen sowie im Endometrium von Endometriosepatientinnen erhöht vor [53, 54]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Östrogen die Expression von COX-2 im Sinne einer positiven Rückkopplung erhöht und in der Folge eine kreisende Verstärkung besteht [55, 56].

PGE₂ agiert als wichtiger Mediator bei Entzündung. Die Synthese von PGE₂ wird durch die Entzündungsreaktion vorangetrieben. So stimulieren die bei Endometriose vermehrt vorkommenden Immunzellen wie Makrophagen und Immunmodulatoren wie Zytokine die COX-2- und somit auch die PGE₂-Synthese [57-59].

Weiterhin wird für Östrogen ein Einfluss auf sensible Neuronen angenommen [60-62]. Östrogen könnte diese direkt aktivieren oder aber deren Sensitivierung bewirken, so

dass das Hormon womöglich auch unmittelbar an der Schmerzentstehung in Endometriose beteiligt ist.

1.2.2.3 Nervenfasern in Endometriose

In der direkten Umgebung von peritonealen Endometrioseläsionen wurden vermehrt Nervenfasern mittels immunhistochemischer Färbung des Panmarkers *Protein Gene Product 9.5* (PGP9.5) nachgewiesen. Zudem wurde gezeigt, dass sich mehr Nervenfasern in der nahen Umgebung zur Läsion finden als in der nicht betroffenen Peripherie. Mit spezifischen Färbungen konnten diese Nervenfasern näher charakterisiert werden. Nervenfasern in peritonealer Endometriose erwiesen sich unter anderem positiv für Substanz P (SP) und *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP), beides Marker für sensorische Nervenfasern mit Vorkommen in schmerzleitenden A δ - und C-Fasern. Weiterhin konnte Neurofilament (NF) nachgewiesen werden, ein Marker für myelinisierende Nervenfasern [63-66].

Die Positivität der Nervenfasern für *Growth Associated Protein 43* (GAP-43), ein Marker für Nervenwachstum, deutet auf ein Neueinsprossen von Nervenfasern in Endometrioseläsionen hin. Unterstützt wird diese Annahme durch den gemeinsamen Verlauf der Nervenfasern mit kleinen unreifen Blutgefäßen abseits der großen Blutgefäße [65].

In einem experimentellen Modell wurde bei Ratten operativ eine Endometriose induziert, so dass typische Endometriose-assoziierte Symptome auftraten. Das mittels Immunhistochemie nachgewiesene Einsprossen von sensiblen Nervenfasern um die Endometrioseläsionen lässt ebenfalls auf eine selbstständige und unabhängige Innervation schließen [67].

Sensorische Nervenfasern schaffen ein proinflammatorisches Milieu, während sympathische Nervenfasern in chronischer Entzündung antiinflammatorisch wirken können [68]. In peritonealen Endometrioseläsionen scheint ein Missverhältnis von sensiblen und sympathischen Nervenfasern vorzuliegen, mit einer im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten sensiblen und verminderten sympathischen Nervenfaserdichte. Auch die Aussprossung von Nervenfasern aus Hühnerembryoganglien, inkubiert in Peritonealflüssigkeit von an Endometriose erkrankten Frauen, stellte sich für sensible Ganglien verstärkt und für sympathische Ganglien verringert da [69].

Eine Korrelation von Klinik und Nervenfaserdichte wird angenommen. In peritonealen Endometrioseläsionen von Patientinnen mit Angabe starker Schmerzen konnte eine

signifikant höhere Gesamtnervenfasernzahl als bei Patientinnen mit geringerer Schmerzsymptomatik nachgewiesen werden [64]. Ebenso konnte ein hormoneller Einfluss auf die Nervenfaserdichte aufgezeigt werden. In Patientinnen mit Endometriose, die sich einer hormonellen Behandlung unterzogen, wurde eine geringere Nervenfaserdichte in Endometrium, Myometrium und peritonealen Endometrioseläsionen gezählt als bei Patientinnen mit Endometriose ohne Hormontherapie [70, 71]. Die Untersuchung peritonealer Endometrioseläsionen in den Phasen des weiblichen Zyklus ließ keine Unterschiede in der Anzahl der Nervenfasern zwischen den verschiedenen Phasen erkennen [72].

Nervenfasern in Endometriose scheinen direkt an der Schmerzpathogenese beteiligt, als auch im Rahmen der chronischen Entzündungsreaktion von Bedeutung zu sein.

1.2.2.4 Neurotrophine in Endometriose

Neurotrophine sind wichtige Signalfaktoren im Nervensystem, die Überleben, Wachstum und Funktion von Nervenzellen sichern, aber auch den programmierten Zelltod einleiten können. Die Wirkung der Neurotrophine ist dabei abhängig von der Entwicklungsphase des Lebewesens, der Abstammung der Nervenzellen, der Affinität der Neurotrophine am Rezeptor sowie der Rezeptor-Dichte bzw. dem Verhältnis der Rezeptoren zueinander. Zu den Neurotrophinen zählen unter anderen der *Nerve Growth Factor* (NGF), der *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) und Neurotrophin-3 (NT-3). Als Rezeptoren dienen allen Neurotrophinen der *Nerve Growth Factor Receptor p75* (NGFRp75). Die Tyrosinkinase-Rezeptoren A, B und C (TrkA, TrkB, TrkC) bevorzugen jeweils nur einzelne Neurotrophine. NGF ist vorrangig Ligand an TrkA, BDNF an TrkB und NT-3 an TrkC [73-75].

Inzwischen sind neben neurotrophen Eigenschaften auch weitere Funktionen der Neurotrophine bekannt. NGF als Hauptvertreter der Neurotrophine regt nicht nur das Nervenwachstum an, sondern wird auch ein Einfluss im Rahmen von Entzündung und der Entstehung von Schmerz zugeschrieben. Hinweise geben das erhöhte Vorkommen von NGF in entzündeten Regionen, die Stimulation von Mastzellen zur Degranulation mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die Synthese von SP und CGRP sowie die Sensitivierung von Nozizeptoren. Diese Zusammenhänge wurden bereits untersucht und deuten darauf hin, dass NGF als Schmerzmediator bei Entzündung agiert [38, 76-79]. Die Neurotrophine BDNF und NT-3 sind bislang weniger detailliert erforscht. Die

Synthese von BDNF scheint durch Entzündungsreize als auch durch NGF stimuliert zu werden. So könnte BDNF zur Schmerzentstehung beitragen [78, 80-82]. Für NT-3 hingegen ließen sich in Studien sowohl anti- als auch pronozizeptive Effekte feststellen [77, 78, 83].

Der Einfluss von Neurotrophinen auf das Einsprossen von Nervenfasern wurde für die Endometriose untersucht. Alle Neurotrophine konnten in peritonealen Endometrioseläsionen von Patientinnen mit Endometriose nachgewiesen werden [84]. Allerdings wiesen weitere Studien widersprüchliche Ergebnisse auf. In Läsionen peritonealer Endometriose konnte NGF nachgewiesen werden [63, 65]. In einem Wachstums-Assay konnte ein Nervenwachstum aus Hühnerembryoganglien inkubiert in Peritonealflüssigkeit von Patientinnen mit Endometriose beobachtet und mittels NGF-Inhibitor anschließend wieder reduziert werden [85, 86]. Zudem konnten Endometrioseläsionen positiv für NGFRp75 gefärbt werden [63, 70].

Neurotrophine könnten somit direkte neurotrophe Effekte auf Nervenfasern haben als auch Anteil an der Entzündungsreaktion in Endometriose nehmen und folglich zur Schmerzentstehung beitragen.

1.2.2.5 Zusammenfassung der zum Schmerz führenden Mechanismen

Die Klinik der Endometriose ist geprägt durch das Auftreten von Schmerzen, wobei die Schmerzintensität nicht mit der Ausbreitung der Erkrankung korreliert. Gegenwärtig ist die Schmerzpathogenese der Endometriose in ihrer Komplexität nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass insbesondere sensible Nervenfasern eine wesentliche Rolle spielen. Die Aktivierung und Sensitivierung dieser sensiblen Nervenfasern könnte durch Neurotrophine wie NGF als auch durch chronische Entzündungsprozesse und Hormone wie Östrogen stimuliert werden. Die Interaktion eben dieser verschiedenen Faktoren miteinander könnte auch zu der individuell unterschiedlichen Schmerzsymptomatik beitragen.

1.3 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom zählt mit knapp 3% der jährlichen Neuerkrankungen in den USA zu den eher selten vorkommenden Karzinomen des weiblichen Geschlechts, ist aber trotz alledem die fünfthäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen bei der Frau [87].

Die Einteilung in Stadien erfolgt anhand der TNM-Klassifikation oder alternativ der Klassifikation der *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), wobei die Stadien beider Klassifikationssysteme einander entsprechen [88]. Zudem werden epitheliale Tumoren von Keimzelltumoren und Keimbahn-Stroma-Tumoren unterschieden. Die mit Abstand am häufigsten vorliegenden epithelialen Tumoren werden weiterhin unterteilt, wobei sich vor allem der seröse und der muzinöse Subtyp finden lassen [89].

Das Ovarialkarzinom präsentiert sich klinisch meist mit wenig spezifischen Symptomen. Zudem treten in frühen Stadien weniger Symptome auf als in fortgeschrittenen Stadien [90]. Demzufolge ist das frühzeitige Stellen der Diagnose erschwert. Häufig liegt dann bei initialer Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Stadium FIGO III oder IV mit Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens vor. Das Stadium der Erkrankung steht in enger Verbindung mit der Überlebensrate. Wird die Diagnose in frühen Stadien gestellt, so haben diese Frauen weitaus bessere Überlebenschancen als Frauen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom [91, 92].

Einige Studien haben versucht die klinische Präsentation des Ovarialkarzinoms zu erfassen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten Symptome ausgemacht werden, die sich bei initialer Diagnose eines Ovarialkarzinoms mit diesem als assoziiert erwiesen. Zu den bei Ovarialkarzinom auftretenden Symptomen zählen vor allem unspezifische gastrointestinale Symptome wie abdominelle Schmerzen, Zunahme des Bauchumfanges und Völlegefühl sowie systemische Zeichen eines Tumorgeschehens wie Gewichtsverlust, Kurzatmigkeit und Fatigue. Auch Symptome ausgehend vom Urogenitaltrakt wie Unterbauschmerzen und Harndrang wurden beschrieben. Allerdings bestehen Unterschiede zwischen den Studien, was den Nutzen in der klinischen Identifikation der Frauen mit erhöhtem Risiko für ein Ovarialkarzinom einschränkt [93-95].

Die Diagnose kann nur durch operative Beurteilung und histopathologische Untersuchung gestellt werden. Klinische Präsentation, Untersuchung und Bildgebung können dabei Anlass zum operativen Staging geben. Für die Bildgebung hat dabei der transva-

ginale Ultraschall die höchste Aussagekraft. Der Ultraschall zusammen mit dem beim Ovarialkarzinom meist erhöhten Tumormarker *Cancer-Antigen 125* (CA-125) wurden als Parameter für ein Screening zur frühzeitigen Diagnostik untersucht, ein durchschlagender Erfolg konnte hierbei allerdings nicht erzielt werden [96-98].

Die radikale Operation mit dem Ziel der Tumorfreiheit steht therapeutisch an erster Stelle. Eine anschließende platinhaltige Chemotherapie verbessert zumeist die Prognose.

1.3.1 Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

Unter dem Begriff Peritonealkarzinose wird das Vorliegen von malignen Tumorzellen im Peritoneum verstanden. Diese Tumorzellen können primär aus dem Peritoneum stammen, wesentlich häufiger allerdings sind Tumoren aus dem Bauchraum der Ausgangspunkt. In der Gynäkologie ist das Ovarialkarzinom als Ursache sekundärer Absiedlungen im Peritoneum von Bedeutung. Eine Peritonealkarzinose ist beim Ovarialkarzinom zumeist mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung vergesellschaftet, wird jedoch in 60-80% der Fälle bereits bei Erstdiagnose vorgefunden. Damit ist die Peritonealkarzinose beim Ovarialkarzinom deutlich häufiger anzutreffen als in anderen Entitäten. Auch Rezidive des Ovarialkarzinoms finden sich häufig im Peritoneum wieder [99, 100].

Wenn bei Tumoren allgemein hin sonst oftmals die hämatogene und lymphogene Metastasierung im Vordergrund steht, so wird inzwischen davon ausgegangen, dass die Peritonealkarzinose beim Ovarialkarzinom durch intraperitoneale Dissemination von Tumorzellen verursacht wird. Dazu müssen sich die Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen. In der Peritonealhöhle werden sie von der Peritonealflüssigkeit verteilt und müssen sich dann an das Peritoneum anheften.

1.3.2 Mechanismen der Schmerzpathogenese der Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom

Die klinischen Symptome des Ovarialkarzinoms sind unspezifisch. Das verdrängende Wachstum einer Peritonealkarzinose kann mit Störungen der jeweils betroffenen Organstruktur einhergehen und so beispielsweise eine Stenose des Darmes hervorrufen. Auch die vermehrte Ansammlung von Flüssigkeit in der Peritonealhöhle (Aszites) kann mit einer Zunahme des Bauchumfanges, Völlegefühl sowie abdominellen Beschwerden

wie Schmerz einhergehen. Jedoch sind diese Zeichen keinesfalls pathognomisch und treten auch nicht regulär in Erscheinung [99].

Beschwerden und Schmerzen, die durch die Peritonealkarzinose eines Ovarialkarzinoms hervorgerufen werden können, sind bislang nicht hinsichtlich pathogenetischer Mechanismen untersucht worden. Ob Schmerzen überhaupt primär durch eine Manifestation der Peritonealkarzinose im Peritoneum ausgelöst werden scheint unklar. Vielmehr könnten Schmerzen vorrangig sekundär durch Befall der viszeralen Organe bedingt sein.

1.4 Fragestellung

Das Peritoneum ist eine seröse Haut und kleidet die Peritonealhöhle aus. Das parietale Blatt des Peritoneums wird somatisch innerviert, das viszerale Blatt durch viszerale sensorische Afferenzen. Die Erkrankungen des Peritoneums sind vielfältiger Genese. Sie können mit Schmerzen einhergehen, jedoch ist neben der Innervation wenig über die Schmerzpathomechanismen der Erkrankungen des Peritoneums bekannt.

Aus gynäkologischer Sicht sind die peritoneale Endometriose und die Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms als Pathologien des Peritoneums von Relevanz. Bei beiden Erkrankungen wird angenommen, dass sich die Zellen sekundär im Peritoneum etablieren. Klinisch charakteristisch für die Endometriose sind in erster Linie Schmerzen, wobei schon kleinste peritoneale Endometrioseläsionen beachtliche Schmerzen verursachen können. Dahingegen tritt eine Peritonealkarzinose, wie sie bei bereits fortgeschrittenem Ovarialkarzinom häufig und großflächig ausgedehnt zu finden ist, meist nur mit unspezifischen Symptomen in Erscheinung. Diese Diskrepanz zwischen Ausdehnung des operativen Befundes und Ausprägung der Schmerzen bei peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose ist eindrucksvoll.

Da für die Schmerzentstehung bei peritonealer Endometriose unter anderem das Neueinsprossen von Nervenfasern sowie ein Einfluss von neurotrophen Faktoren angenommen wird, sollten dies in dieser Arbeit der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms gegenübergestellt werden. Dazu wurden vergleichende Untersuchungen des Gewebes hinsichtlich der Expression von Nervenfasern und Neurotrophinen durchgeführt. Des Weiteren wurden Neurotrophine und neurotrophe Wachstumseigenschaften in Peritoneal- sowie Aszitesflüssigkeiten untersucht sowie die Konzentration des an Nervenfasern modulierenden Östrogens.

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche schmerzpathogenetische Aspekte der peritonealen Endometriose im Gegensatz zur Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms aufzudecken und so Rückschlüsse auf die Vorgänge bei Endometriose ziehen zu können. Ein besseres Verständnis für die Pathogenese des Schmerzes bei Endometriose könnte dazu beitragen, neue wirksame Therapiemethoden zu entwickeln.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage RC 210 S	Sartorius AG, Deutschland
Brutmaschine Modell 3000	Jane Schütz GmbH, Deutschland
CO ₂ -Incubator BD 6220	Heraeus Deutschland
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Deutschland
Elektronische Präzisionswaage SE1501	VWR International
Entwicklermaschine X-OMAT 1000 Processor	Kodak, USA
Gefrierschrank , -20°C	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank Ultra low, -80°C	Sanyo, Deutschland
Hybridisierungsofen Compact Line OV4	Biometra, Deutschland
Inversmikroskop Axiovert 40	Carl Zeiss AG, Deutschland
Kamera Canon PowerShot G5 PC1049	Canon, Japan
Kamera AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Deutschland
Kühlschrank, 4°C	Bosch, Deutschland
Labofuge 400R	Heraeus Deutschland
Labor-Analysesystem Cobas 6000	Roche Holding GmbH, Deutschland
Laborglas-Trockenschrank	Ehret GmbH, Deutschland
Labor-pH-Meter 765	Knick, Deutschland

Lichtmikroskop Axiophot 40 CFL	Carl Zeiss AG, Deutschland
Magnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control	IKA-Werke, Deutschland
Mikrotom HM 400R	Microtom International GmbH, Deutschland
Mini-PROTEAN® 3 System	Bio-RAD, Deutschland
Mini Trans-Blot Cell	Bio-RAD, Deutschland
MS-1 Minishaker Vortexer	IKA-Werke, Deutschland
Multiscan FC Microplate Photometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Pinzetten (spitz und gebogen)	A. Dumont & Fils, Schweiz
Pipetus®	Hirschmann, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph, Deutschland
Reinstwassererzeuger Milli-Q biocel A10	Millipore, USA
Research Pipetten	Eppendorf Research, Deutschland
Saugmaschine	HLC Biotech, Deutschland
Schere BC 464	Aesculap AG, Deutschland
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu, Deutschland
Sprout® Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific, USA
Stromgeber PowerPac 200 Supply	Bio-RAD, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf, Deutschland
Tissue Cool Plate COP 20	Medite Medizintechnik, Deutschland
Universalschrank Modell UNB 100	Memmert, Deutschland
Wärmebad	Medax, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser Cover glass, 24x50mm	R.Langenbrinck, Deutschland
Einweg-Pasteurpipette	Carl Roth, Deutschland
Falcon Serologische Pipetten	Becton, Dickinson and Company, USA
Falcon Tubes, 15ml	Becton Dickinson Labware, USA
Filterpapier Whatman Grad 703 Blotting Paper	VWR International, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Deutschland
Lab-Tek Chamber slide system	Nalge Nunc International, USA
Mikrotom-Klingen	Feather, Japan
Objektträger Super Frost Plus	R.Langenbrinck, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, USA
Petrischalen Nunclon Surface	Nunc, Dänemark
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
PolyScreen® PVDF Transfer Membrane	Perkin Elmer, Deutschland
Röhrchen steril	Greiner Labortechnik, Deutschland
Röntgenfilm, Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhre 50ml	Sarstedt, Deutschland
Safe seal Reagiergefäße, 2ml	Sarstedt, Deutschland
Valo SPF Eier	Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland

2.1.3 Substanzen und Chemikalien

Substanzen / Chemikalien	Hersteller
Acrylamide/bis-acrylamide, 40% solution	Sigma-Aldrich, USA
Ammonium persulfate	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako Cytomation, Dänemark
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Biotin Blocking System	Dako Cytomation, Dänemark
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Deutschland
Dako Pen	Dako Cytomation, Dänemark
Dimethylsulfoxide (DMSO) p.A.	Biomol GmbH, Deutschland
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PAA Laboratories GmbH, Österreich
DTT	Bio-RAD, Deutschland
ECLTM Western Blotting Detection Reagent Kit	Amersham Bioscience, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol (100%, 96%, 80%, 70%)	Merck KGaA, Deutschland
Eukitt®	Sigma-Aldrich, USA
Fast Red Substrate System	Thermo Fisher Scientific, USA
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Deutschland
Glycine	Sigma-Aldrich, USA

H ₂ O ₂ (30%)	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol	Serva Elektrophoresis GmbH, Deutschland
Kollagen IV	Biochrom AG, Deutschland
Luminol sodium salt	Sigma-Aldrich, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Merck KgaA, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth, Deutschland
NGF 2,5S (0,1ng/ml)	Sigma-Aldrich, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA
Paraformaldehydlösung	Merck KGaA, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Deutschland
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, USA
Roti®-Free Stripping-Puffer	Carl Roth, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Deutschland
Salzsäure rauchend 37%	Carl Roth, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
Streptavidin-AP Conjugate	Roche Diagnostics, Schweiz
TEMED	Carl Roth, Deutschland
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA, Deutschland
Trizma® base	Sigma-Aldrich, USA
Trizma® hydrochloride	Sigma-Aldrich, USA

Tween® 20	Sigma-Aldrich, USA
Xylol	Carl Roth, Deutschland

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Immunhistochemie

Primäre Antikörper	Hersteller
PGP9.5 (polyklonal, Kaninchen)	Dako Cytomation, Dänemark
SP (monoklonal, Ratte)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
NGF (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
NT-3 (polyklonal, Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
BDNF (monoklonal, Maus)	Abcam, UK

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Maus-Anti-Kaninchen	Dianova GmbH, Deutschland
Kaninchen-Anti-Ratte	Dako Cytomation, Dänemark
Kaninchen-Anti-Maus	Jackson ImmunoResearch, USA
Kaninchen-Anti-Ziege	Dako Cytomation, Dänemark

2.1.4.2 Western Blot

Primäre Antikörper	Hersteller
NGF (polyklonal, Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
NT-3 (polyklonal, Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
BDNF (monoklonal, Maus)	Abcam, UK
Beta-Aktin (polyklonal, Ziege)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

Sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt)	Hersteller
Ziege-Anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, USA
Kaninchen-Anti-Ziege	Jackson ImmunoResearch, USA
Kaninchen-Anti-Maus	Jackson ImmunoResearch, USA

2.1.5 Lösungen

2.1.5.1 Immunhistochemie

2.1.5.1.1 Puffer

Tris-Puffer (pH 7,4)	Tris-HCl		0,6 % / 38 mM
	Tris-Base		0,08 %
	NaCl		0,8 %
Tris-EDTA-Puffer (pH 9)	Tris-Base		10 mM
	EDTA		1 mM
	Tween 20		0,05%
Citratpuffer (pH 7,4)	Lösung A	Zitronensäure	0,1 M
	Lösung B	Natriumcitrat	0,1 M
	Für 250 ml Citratpuffer: 4,5ml Lösung A + 20,5ml Lösung B.		

2.1.5.2 Western Blot

2.1.5.2.1 Polyacrylamidgele

Sammelgel	Tris-HCl, pH 6,8	87,5 mM
	SDS	0,1 %
	Acrylamid	5 %
	APS	0,1%
	TEMED	0,1%
Trenngel (12 %)	Tris-HCl, pH 6,8	375 mM
	SDS	0,1 %
	Acrylamid	12 %
	APS	0,24 %
	TEMED	0,1 %

2.1.5.2.2 Puffer

Elektrophoresepuffer, pH 8,3	Tris-Base Glycin SDS	25 mM 192 mM 1 %
Transferpuffer, pH 8,3	Tris-Base Glycin Ethanol	25 mM 192 mM 10 %
Blockierungspuffer, pH 7,4	Tris-Base NaCl Tween 20	10 mM 150 mM 0,1 %
4x Proteinladepuffer, pH 6,8	Tris-HCl SDS Glycerin DTT Bromphenolblau	200 mM 8 % 40 % 40 % 0,01 %

2.1.5.2.3 Entwicklerlösung

Ansetzen der Lösungen		
Lösung A	0,1 M Tris-HCl, pH 6,8 Luminol	200 ml 50 mg
Lösung B	para-Hydroxycoumarinsäure DMSO	5,5 mg 5 ml
Entwicklerlösung für 10x7cm Membran		
1ml Lösung A + 100 µl Lösung B + 0,3 µl H ₂ O ₂ (30 %)		

2.1.6 Software

Programm	Hersteller
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, Inc., USA
ImageJ	National Institutes of Health (NIH), USA
AxioVision Release 4.8	Carl Zeiss AG, Deutschland
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, USA
Endnote	Thomson Research Software, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl des Patientinnenkollektivs

Die für die hier durchgeführten Untersuchungen ermittelten Frauen waren Patientinnen an der Klinik für Gynäkologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Sie unterzogen sich alle im Zeitraum von 2001 bis 2012 einer Laparoskopie oder Laparotomie zur Diagnosesicherung oder operativen Therapie einer Endometriose bzw. eines Ovarialkarzinoms oder wurden im Rahmen der Abklärung von Unterbauchschmerzen bzw. anderer gynäkologischer Beschwerden operiert. Zwei weitere Patientinnen wurden zudem im Jahr 2012 in der Klinik für Gynäkologie des Vivantes Auguste-Viktoria-Klinikum Berlin und im Klinikum Dahme-Spreewald GmbH Königs Wusterhausen rekrutiert. Alle Patientinnen erklärten zuvor ihr Einverständnis zur Verwendung gewonnener Materialien für die Forschung. Bei den untersuchten Materialien handelte es sich um regelhaft während der Operation im Sinne der Diagnostik entnommene Peritonealflüssigkeit (PF) bzw. Aszitesflüssigkeit (AF) und Gewebeproben. Alle Proben wurden gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin gewonnen (Ethikvotum: EA 4/036/12).

Die PF bzw. die AF wurden prospektiv entnommen und dazu die Flüssigkeit zu Beginn des operativen Eingriffes unverdünnt abgesaugt. Retrospektiv wurde dann die Diagnose mithilfe des Operationsberichtes und des vom Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin anfertigten histopathologischen Befundes überprüft. Die Gewebeproben mit den entsprechenden Läsionen bzw. Tumorknoten wurden retrospektiv anhand des Operationsberichtes und des histopathologischen Befundes ausgewählt. Bei der Auswahl wurden jeweils dieselben Ansprüche für Patientinnen mit Entnahme von PF bzw. AF und Gewebeentnahme geltend gemacht.

Alle Patientinnen der Endometriosegruppe befanden sich im reproduktionsfähigen Alter. Es wurde intraoperativ und/oder histologisch eine peritoneale Endometriose (pEM) nachgewiesen. Bei Patientinnen der Ovarialkarzinomgruppe wurde histologisch ein Ovarialkarzinom mit Peritonealkarzinose (pOC) diagnostiziert. Als Kontrollgruppe wurden Patientinnen im reproduktionsfähigen Alter ausgewählt, bei denen kein Anhalt für das Vorliegen einer Endometriose oder einer malignen Erkrankung bestand. Zur Entnahme von PF und AF wurden Patientinnen mit histologisch gesichertem Uterus myomatosus als Kontrolle ausgewählt. Histologisch gesundes Peritoneum wurde von Frauen verwendet, bei denen im Rahmen einer Hysterektomie Peritoneum entnommen und

histologisch untersucht wurde. Patientinnen bei denen wesentliche Nebendiagnosen wie entzündliche, maligne oder endokrine Erkrankungen zum Zeitpunkt der Probenentnahme bestanden wurden ausgeschlossen.

Alle klinischen Angaben zu den Patientinnen wurden der Patientenakte entnommen. Die Zyklusphase wurde anhand der Angabe zur letzten Regel errechnet und/oder aus dem histopathologischen Befund entnommen. Patientinnen mit Hormoneinnahme oder Patientinnen in der Peri- oder Postmenopause wurden gesondert erfasst. Patientinnen über 65 Jahre wurden anhand des Alters als postmenopausal eingeordnet. Zudem wurde das Bestehen von abdominalen Schmerzen erfasst. Dazu wurden die für die Endometriose typischen Schmerzen wie Dysmenorrhö oder zyklische Unterbauchschmerzen von unspezifischen Schmerzen unterschieden. Weiterhin wurde eine eventuell stattgehabte präoperative Chemotherapie eines Ovarialkarzinoms vermerkt sowie für alle Patientengruppen das Vorliegen eines Rezidivs. Für die Endometriosegruppe wurde zusätzlich das rASRM-Stadium erfasst sowie der histologische Subtyp in der Ovarialkarzinomgruppe.

Für die immunhistochemischen Analysen wurden Gewebeproben von 18 Patientinnen mit peritonealer Endometriose und 15 Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom sowie 15 Peritoneen gesunder Frauen verwendet. Zudem konnten insgesamt 23 PF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose, 25 AF von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom und 20 PF von Patientinnen mit Uterus myomatosus als Kontrollgruppe in die Untersuchungen eingeschlossen werden. Für die Analysen mittels Western Blot wurden alle PF bzw. AF untersucht. Da für die Bestimmung der Östrogenkonzentration als auch für den Neuronalen Wachstumsassay größere Mengen der PF und AF benötigt wurden, konnten nicht alle Flüssigkeiten für diese Untersuchungen herangezogen werden. Die Östrogenkonzentration konnte in 21 PF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose, 21 AF von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom und 13 PF von Patientinnen der Kontrollgruppe bestimmt werden. Für den Neuronalen Wachstumsassay wurden jeweils 12 PF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose und 12 PF von Patientinnen der Kontrollgruppe nach Verfügbarkeit zufällig ausgewählt. 24 AF der Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom fanden in diesem Assay Verwendung.

2.2.1.1 Patientinnen für die Immunhistochemische Analyse

Für die verschiedenen immunhistochemischen Analysen von Gewebe wurden 18 Patientinnen mit peritonealer Endometriose, 15 Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom sowie 15 Peritoneen gesunder Frauen ausgewählt. Die Patientinnen der Endometriosegruppe waren im Mittel $33,2 \pm 6,7$ Jahre alt, die der Ovarialkarzinomgruppe $51,9 \pm 7,1$ Jahre (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für die IHC-Analyse.

		pEM	pOC
Anzahl		18	15
Alter (in Jahren)	Mittelwert	$33,2 \pm 6,7$	$51,9 \pm 7,1$
	Spanne	22-48	29-58
Hormoneinnahme		3	0
Zyklusphase	Menstruation	1	0
	Proliferation	9	0
	Sekretion	5	0
	Perimenopause	0	0
	Postmenopause	0	6
	unbekannt	0	9
Abdominalschmerzen	nein	3	8
	Endometriose-typisch	15	0
	unspezifisch	0	7
präoperative Chemotherapie	ja		7
	< 6 Mo. vor OP		4
	> 6 Mo. vor OP		3
	nein		8
Rezidiv	ja	9	7
	nein	9	8
rASRM-Stadium der Endometriose	I	5	
	II	6	
	III	4	
	IV	3	
Histologischer Subtyp des Ovarialkarzinoms	Serös-papilläres Zystadenokarzinom		15
	Klarzellkarzinom		0
	Karzinoid		0
	Granulosazelltumor		0

2.2.1.2 Patientinnen für die Western Blot-Analyse

Für die Western Blot-Analyse von Neurotrophinen in PF und AF wurden 23 Patientinnen mit peritonealer Endometriose, 25 Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom und 20 Patientinnen als Kontrolle ausgewählt. Die Patientinnen der Endometriose-gruppe waren im Mittel $31,7 \pm 8,6$ Jahre alt, die der Ovarialkarzinomgruppe $31,7 \pm 8,6$ Jahre und die der Kontrollgruppe $31,7 \pm 8,6$ Jahre (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für die WB-Analyse.

		pEM	pOC	KG
Anzahl		23	25	20
Alter (in Jahren)	Mittelwert	$31,7 \pm 8,6$	$68,6 \pm 11,4$	$40,1 \pm 5,7$
	Spanne	18-47	44-88	28-50
Hormoneinnahme		8	0	1
Zyklusphase	Menstruation	2	0	2
	Proliferation	6	0	8
	Sekretion	7	0	9
	Perimenopause	0	2	0
	Postmenopause	0	23	0
Abdominal-schmerzen	nein	5	14	13
	Endometriose-typisch	18	0	0
	unspezifisch	0	11	7
präoperative Chemotherapie	ja		7	
	< 6 Mo. vor OP		5	
	> 6 Mo. vor OP		2	
	nein		18	
Rezidiv	ja	11	3	2
	nein	12	22	18
rASRM-Stadium der Endometriose	I	11		
	II	6		
	III	3		
	IV	3		
Histologischer Subtyp des Ovarialkarzinoms	Serös-papilläres Zystadenokarzinom		21	
	Klarzellkarzinom		1	
	Karzinoid		2	
	Granulosazelltumor		1	

2.2.1.3 Patientinnen für die Bestimmung von Östrogen

Für die Bestimmung der Östrogenkonzentration in PF und AF wurden 21 Patientinnen mit peritonealer Endometriose, 21 Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom und 13 Patientinnen als Kontrolle ausgewählt. Die Patientinnen der Endometriosegruppe waren im Mittel $31,3 \pm 8,7$ Jahre alt, die der Ovarialkarzinomgruppe $66,8 \pm 11$ Jahre und die der Kontrollgruppe $40,2 \pm 5,8$ Jahre (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für die Bestimmung von Östrogen.

		pEM	pOC	KG
Anzahl		21	21	13
Alter (in Jahren)	Mittelwert	$31,3 \pm 8,7$	$66,8 \pm 11$	$40,2 \pm 5,8$
	Spanne	18-47	44-82	31-51
Hormoneinnahme		7	0	0
Zyklusphase	Menstruation	2	0	2
	Proliferation	5	0	4
	Sekretion	7	0	7
	Perimenopause	0	2	0
	Postmenopause	0	19	0
Abdominalschmerzen	nein	5	11	7
	Endometriose-typisch	16	0	0
	unspezifisch	0	10	6
präoperative Chemotherapie	ja		6	
	< 6 Mo. vor OP		4	
	> 6 Mo. vor OP		2	
	nein		15	
Rezidiv	ja	10	3	0
	nein	11	18	13
rASRM-Stadium der Endometriose	I	9		
	II	6		
	III	3		
	IV	3		
Histologischer Subtyp des Ovarialkarzinoms	Serös-papilläres Zystadenokarzinom		18	
	Klarzellkarzinom		1	
	Karzinoid		1	
	Karzinoid		2	

2.2.1.4 Patientinnen für den neuronalen Wachstums-Assay

Zur Beurteilung der Nervenausprossung von Ganglien inkubiert mit PF und AF wurden für den neuronalen Wachstums-Assay 12 Patientinnen mit peritonealer Endometriose, 24 Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom und 12 Patientinnen als Kontrolle ausgewählt. Die Patientinnen der Endometriosegruppe waren im Mittel $31,1 \pm 7,4$ Jahre alt, die der Ovarialkarzinomgruppe $69,4 \pm 10,8$ Jahre und die der Kontrollgruppe $38,7 \pm 5,8$ Jahre (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Charakterisierung des Patientinnenkollektivs für den NWA.

		pEM	pOC	KG
Anzahl		12	24	12
Alter (in Jahren)	Mittelwert	$31,1 \pm 7,4$	$69,4 \pm 10,8$	$38,7 \pm 5,8$
	Spanne	18-43	44-88	28-47
Hormoneinnahme		4	0	1
Zyklusphase	Menstruation	1	0	1
	Proliferation	3	0	4
	Sekretion	4	0	6
	Perimenopause	0	2	0
	Postmenopause	0	22	0
Abdominalschmerzen	nein	3	14	9
	Endometriose-typisch	9	0	0
	unspezifisch	0	10	3
präoperative Chemotherapie	ja		7	
	< 6 Mo. vor OP		5	
	> 6 Mo. vor OP		2	
	nein		17	
Rezidiv	ja	7	2	1
	nein	5	22	11
rASRM-Stadium der Endometriose	I	7		
	II	2		
	III	2		
	IV	1		
Histologischer Subtyp des Ovarialkarzinoms	Serös-papilläres Zystadenokarzinom		20	
	Klarzellkarzinom		1	
	Karzinoid		2	
	Granulosazelltumor		1	

2.2.2 Probenmaterialgewinnung

2.2.2.1 Peritoneal- und Aszitesflüssigkeit

Die PF bzw. AF wurde zu Beginn des operativen Eingriffes unverdünnt entnommen. Im Anschluss wurden sie mit 3000rpm zentrifugiert und der Überstand bei -80°C tiefgefroren. Etwaige Transportwege wurden gekühlt zurückgelegt.

2.2.2.2 Gewebe

Gewebe, das während der Operation entfernt wurde, wurde noch im Operationssaal in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Im Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin wurden die Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol getränkt und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Blöcke wurden bestellt und für die hier durchgeführten Untersuchungen genutzt.

2.2.3 Immunhistochemie

Zum Nachweis von PGP9.5, SP, NGF, NT-3 und BDNF in peritonealen Endometrioseläsionen und Peritonealkarzinomen bei Ovarialkarzinom wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Es wurde manuell unter Anwendung der LSAB-Methode gefärbt. Hierbei bindet der Primärantikörper an das vom Gewebe präsentierte Antigen. An den Primärantikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper, an den sich wiederum Enzym-konjugiertes Streptavidin anbindet. Die Farbentwicklung erfolgt mittels eines Chromogens.

2.2.3.1 Durchführung

Von den paraffinierten Blöcken wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Gewebeschnitte wurden für 16 Stunden bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden sie für je zweimal 10 Minuten in Xylol getaucht, in einer absteigenden Alkoholreihe erst 10 Minuten in 100%igem Ethanol, dann je 5 Minuten in 96%igem, 80%igem und 70%igem Ethanol rehydriert und in Tris-Puffer überführt.

Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte im Dampfgerät für 40 Minuten in Citrat- oder Tris-EDTA-Puffer vorbehandelt und danach für 10 Minuten in Tris-Puffer gespült. Erforderlichenfalls wurden die Gewebeschnitte mit dem *Biotin Blocking System* oder fetalem Kälberserum behandelt um endogene Enzymaktivitäten zu blockieren und Hintergründe zu reduzieren.

Der Primär- und der Sekundärantikörper sowie das mit Alkalischer Phosphatase markierte Streptavidin wurden in *Antibody Diluent* mit der jeweilig etablierten Konzentration angesetzt. Je Schnitt wurden 150µl aufgetragen und für bestimmte Zeiten in horizontaler Lage in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur oder bei 4°C inkubiert (s. Tabelle 5). Die chromogene Nachweissubstanz *Fast Red Substrate System* wurde nach Herstellerangaben angefertigt und die Schnitte damit für 20 Minuten inkubiert. Nach jedem dieser Inkubationsschritte wurden die Schnitte gründlich mit Tris-Puffer gespült, um das vorherig aufgetragene Reagenz zu entfernen.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in Aquadest gewaschen, für 45 Sekunden in Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt und nochmals gründlich unter fließendem Wasser gespült. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden sie mit Eukitt® Einschlussmedium eingedeckt.

Bei jedem immunhistochemischen Färbedurchgang wurden Negativkontrollen zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse durch unspezifische Antikörperbindung mitgefärbt. Hierzu wurde der Primärantikörper durch Tris-Puffer ausgetauscht.

Als Positivkontrolle in den jeweiligen Färbungen wurden die in der Etablierung genutzten Gewebeschnitte von gesunder Niere, Haut und Mausegehirn verwendet.

Tabelle 5: Zusammenstellung der Protokolle für die Immunhistochemie.

Angaben zu den jeweils verwendeten Puffer- und Blockierungslösungen sowie zu den Inkubationszeiten und Temperaturen der immunhistochemischen Analysen für PGP9.5, NGF, NT-3 und BDNF.

	Dampfgaren	Blockieren	Primär-antikörper	Sekundär-antikörper
PGP9.5	Citratpuffer (40min)		1:300 (75min bei RT)	1:400 (45min bei RT)
SP	Citratpuffer (20min)		1:100 (60min bei RT)	1:400 (60min bei RT)
NGF	Tris-EDTA-Puffer (40min)	Biotin-Block (10min bei RT) FKS (20min bei RT)	1:100 (60min bei RT)	1:400 (40min bei RT)
NT-3	Tris-EDTA-Puffer (40min)		1:250 (20h bei 4°C)	1:400 (60min bei RT)
BDNF	Tris-EDTA-Puffer (40min)		1:250 (20h bei 4°C)	1:400 (60min bei RT)

2.2.3.2 Immunhistochemische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden in verschiedenen Vergrößerungen (25x, 200x, 400x) zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet.

Zum Nachweis von Nervenfasern wurden in der PGP9.5- sowie der SP-Färbung positive Nervenanschnitte gezählt. Eine Fläche von 1mm², entsprechend dem Sichtfeld in der 200x-Vergrößerung, wurde beurteilt und dazu mittels Hotspot-Methode die Stelle mit den meisten Nervenfasern ausgewählt [101]. Die Anzahl der Nervenfasern im 1mm-Abstand um die Endometrioseläsion, um ein Nest von Tumorzellen der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms oder in der Lamina propria serosae des gesunden Peritoneums wurde ermittelt. Wenn möglich wurde zudem in einem Mindestabstand von 4mm die Nervenfasernzahl eines Hotspots in der Peripherie ausgezählt.

In den NGF-, NT3- und BDNF-Färbungen wurden die genannten Neurotrophine gefärbt. Hierbei wurde die Farbintensität in Schritten von 0,5 mit 0 für keine, 1 für eine schwache, 2 für eine moderate und 3 für eine starke Anfärbung sowie die angefärbte Fläche

von 0-100% beurteilt. Hieraus wurde durch Multiplikation der „Flächen-Intensitäts-Score“ (FIS) gebildet, dessen Werte somit zwischen 0 und 300 lagen [102]. In den Endometriosepräparaten wurde das Epithel und das Stroma der Läsionen beurteilt sowie wenn möglich das Gewebe in der Peripherie. In den Schnitten der Peritonealkarzinosen wurde die Anfärbung der Tumorzellen und die Anfärbung in Umgebung in einem 1mm-Abstand zu den Tumorzellen beurteilt sowie möglichst die Peripherie in einem Mindestabstand von 4mm zu Läsion oder Tumorzellen. In der Kontrollgruppe wurden die gesunden Peritoneen anhand der Anfärbung der direkt unter dem Mesothel liegenden Lamina propria serosae bewertet.

2.2.4 Proteinbiochemische Analysen

2.2.4.1 Bestimmung des Proteingehalts in Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten

In jeder PF bzw. AF wurde der Gesamtproteingehalt mithilfe des BCA-Assay nach Paul K. Smith in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:50 und 1:100) bestimmt. Die BCA-Reagenzien wurden wie vom Hersteller angegeben hergestellt und verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Proben photometrisch mit einer Wellenlänge von 595nm gemessen und ausgewertet.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die in den PF und AF enthaltene Proteinmischung wurde mittels SDS-PAGE nach Ulrich K. Laemmli aufgetrennt. Das 12%ige Polyacrylamidgel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, wurde gegossen und vollständig auspolymerisiert. Jede PF bzw. AF wurde anteilig so mit PBS verdünnt, dass eine Proteinkonzentration von 0,25µg/µl vorlag. Zu den Proben wurde ein Proteinladepuffer mit DTT und SDS gegeben. Anschließend wurden sie bei 96°C für 3 Minuten gekocht. Je 20µl Probe wurden in eine Geltasche aufgetragen. Es wurde ein Gellauf in Elektrophoresepuffer durch das Sammelgel mit 80V für 20 Minuten und durch das Trenngel mit 125V für 75 Minuten gestartet. Zur Ermittlung der Molekülmasse wurde eine Proteinleiter genutzt, als Positivkontrolle die Östrogen-sensitive MCF-7 Brustkrebs-Zelllinie [103, 104].

2.2.4.3 Western Blot

Nun wurden die mithilfe der SDS-PAGE auf dem Polyacrylamidgel separierten Proteine auf die PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde in einem 1:1 Methanol-Aquadest-Gemisch für eine Minute aktiviert und danach in Aquadest gewaschen. Die Membran, das Trenngel, zwei Transferschwämme und zwei Filterpapiere wurden für 10 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde der Transfer in folgender Reihenfolge aufgebaut: Negativer Pol, Schwamm, Filterpapier, Trenngel, Membran, Filterpapier, Schwamm, positiver Pol. Die Tankblotkammer wurde mit dem Transferpuffer aufgefüllt, die Spannungsquelle angelegt und der Transfer mit 100V für 40 Minuten gestartet. Im Anschluss wurde die Membran in Blockierungspuffer über Nacht und bei 4°C gekühlt blockiert.

2.2.4.4 Immundetektion

Zum Nachweis und zur Visualisierung der Proteine NGF, NT-3 und BDNF auf der im Western Blot vorbereiteten Membran, wurde die Membran mit dem in Blockierungspuffer verdünnten primären Antikörper (1:500) für 60 Minuten inkubiert und dann dreimal für 15 Minuten mit dem Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (1:10.000) für 45 Minuten auf die Membran gegeben und die Membran dann dreimal für je 20 Minuten mit Blockierungspuffer gewaschen. Bei Verwendung verschiedener Sekundärantikörper wurden diese nacheinander und mit einem zusätzlichen Waschschrift von dreimal je zehn Minuten inkubiert. Das Strukturprotein Beta-Aktin (1:1.000) wurde zur späteren Berechnung der relativen Quantifizierung simultan mit dem Primärantikörper analysiert. Die Inkubationen fanden bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler statt.

Die Membran wurde getrocknet, für zwei Minuten in der Entwicklerlösung inkubiert und erneut getrocknet. Als nächstes wurde die Membran zwischen zwei Folien in eine Röntgenkassette gelegt. Das Filmpapier wurde je nach Signalintensität zwischen 30 Sekunden und 45 Minuten belichtet und anschließend mit der Entwicklermaschine entwickelt.

Gegebenenfalls wurde ein Antikörper-abtragendes Reagenz auf die Membran gegeben und diese für 30 Minuten bei 56°C im Hybridisierungssofen inkubiert, hinterher in Blockierungspuffer gewaschen und über Nacht bei 4°C blockiert. Am nächsten Tag konnte sie so nochmals mit einem anderen Antikörper verwendet werden.

2.2.4.5 Auswertung des Western Blot

Das fertige Bild wurde durch die Medienabteilung der Charité Universitätsmedizin Berlin im Durchlichtscanner digitalisiert und die Intensität der Proteinbanden am Computer systematisch vermessen (NGF mit 27 kDa, NT-3 mit 35 kDa, BDNF mit 27,8 kDa). Jede einzelne vermessene Bande des jeweils nachzuweisenden Proteins wurde mit dem Ergebnis der jeweiligen Bande des sogenannten „house keeping“-Proteins Beta-Aktin (43 kDa) gegenübergestellt und normalisiert. Die Konzentrationen wurden in Relation zum Mittelwert der Kontrollgruppe bewertet.

2.2.5 Östrogenbestimmung in Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten

Die Bestimmung des Östrogengehaltes in den PF bzw. AF wurden vom Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH durchgeführt. Dazu wurden je 1.000µl Flüssigkeit aufgetaut und eingesendet. PF oder AF mit geringerer Flüssigkeitsmenge konnten demnach nicht untersucht werden. Die Östrogenkonzentration wurde mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) bestimmt.

2.2.6 Neuronaler Wachstums-Assay

Zum Nachweis neuromodulatorischer Eigenschaften der PF und AF wurde ein neuronaler Wachstums-Assay mit Spinalganglien von Hühnerembryonen durchgeführt.

2.2.6.1 Präparation der Hühnerembryo-Spinalganglien

Die befruchteten Eier wurden bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% unter Wendung bebrütet. Nach 9 Tagen wurden die Spinalganglien frei präpariert. Dazu wurde das Ei zuerst in Alkohol getaucht, mit einer Pinzette am stumpfen Ende eröffnet und der Embryo entnommen. Dieser wurde zügig in eine Petrischale mit PBS überführt und mithilfe einer Schere sofort dekapitiert. Nach kurzem Waschen wurde der Körper des Hühnerembryos in eine frische Petrischale gelegt und unter das Mikroskop gestellt. Hier wurde der Bauch längs eröffnet und bis zur Lendenwirbelsäule freigelegt, um die dort seitlich liegenden sensiblen Spinalganglien zu entnehmen. Diese wurden in einer gesonderten mit PBS gefüllten Petrischale gesammelt und anschließend noch einmal von etwaig anhängenden Bindegewebsresten und Nervenstümpfen gesäubert.

2.2.6.2 Durchführung des Versuchs

Um die gesammelten Hühnerembryo-Spinalganglien mit den PF und AF zu inkubieren, wurde eine Mikrotiterplatte genutzt. Diese wurde über Nacht mit im Verhältnis 1:50 verdünntem Kollagen IV in PBS beschichtet. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und dreimal mit PBS gespült. In jeden Schacht wurden 250µl des DMEM-Nährmediums und 250µl der jeweiligen PF gegeben. Für die Positivkontrolle wurde stattdessen im Verhältnis 1:100 in DMEM verdünntes NGF genutzt, während die Negativkontrolle nur das Nährmedium enthielt. Auf den Grund jedes Schachts wurden zwei der fertig präparierten sensiblen Spinalganglien gegeben und bei 37°C und 5% CO₂-Begasung für 48 Stunden kultiviert.

2.2.6.3 Auswertung des neuronalen Wachstums-Assays

Die axonale Aussprossung der Spinalganglien wurde am Mikroskop und mithilfe des Nervenwachstumsscores (NWS) auf einer Skala von 0 bis 3 beurteilt. Keine Aussprossung wurde dabei mit einer 0, vereinzelte Aussprossung mit einer 1, eine einheitlich geschlossene Aussprossung über einem Viertel des Spinalgangliendurchmessers mit einer 2 und über der Hälfte mit einer 3 bewertet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4.0 analysiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Es lagen ausschließlich metrische Variablen in unabhängigen Stichproben vor. Alle in der Auswertung miteinander zu vergleichenden Gruppen wurden auf Normalverteilung geprüft und danach der jeweils anzuwendende statistische Test bestimmt. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte eine Fehlerkorrektur.

Beim Vorliegen von zwei Stichproben wurde für normalverteilte als auch für nicht normalverteilte Stichproben der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der t-Test kam aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht zum Einsatz. Lagen mehr als zwei Stichproben vor, so wurde für normalverteilte Stichproben die *One-way Anova* mit anschließendem *Post-Hoc-Test* nach Bonferroni verwendet. Nicht normalverteilte Stichproben mit mehr als zwei Gruppen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem *Post-Hoc-Test* nach Dunn untersucht. Sollten zwei Gruppen in verschiedenen Gesichtspunkten mitei-

inander verglichen werden, so wurde die *Two-Way Anova* mit anschließendem paarweisem *Post-Hoc-Test* nach Bonferroni angewandt.

Mit einem Signifikanzniveau von 95% galten p-Werte $<0,05$ als signifikant, wobei p-Werte $<0,05$ mit *, $<0,01$ mit ** und $<0,001$ mit *** in Abbildungen dargestellt werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der Nervenfaserdichte und Charakterisierung der Nervenfasern

3.1.1 Bestimmung der Nervenfaserdichte in peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

3.1.1.1 Bestimmung der NF-Dichte in der nahen Umgebung

In einem 1mm-Abstand um peritoneale EM-Läsionen (n=18) wurden im Mittel $3,83 \pm 2,38$ PGP9.5-positive NF/mm² gezählt, um die Peritonealkarzinose bei OC (n=15) wurden $1,07 \pm 1,33$ PGP9.5-positive NF/mm² und in den als KG dienenden gesunden Peritoneen (n=15) wurden $2,73 \pm 1,49$ PGP9.5-positive NF/mm² gezählt. Die Dichte PGP9.5-positiver NF zeigte sich signifikant vermindert bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC im Vergleich zu Patientinnen mit peritonealer EM ($p < 0,001$). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Dichte PGP9.5-positiver NF von Patientinnen mit peritonealer EM sowie der Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC im Vergleich zur KG (s. Abbildung 3 (A), s. Abbildung 4).

3.1.1.2 Bestimmung der NF-Dichte in der Peripherie

In der Peripherie peritonealer EM (n=18) wurden im Mittel $1,94 \pm 1,21$ PGP9.5-positive NF/mm² gezählt. In 11 von 15 Schnitten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC konnte die NF-Dichte mit durchschnittlich $1,45 \pm 1,21$ PGP9.5-positiver NF/mm² bestimmt werden. Die übrigen Schnitte entsprachen durch das diffuse Vorkommen von Tumorzellen im gesamten Schnitt nicht der Definition der Peripherie. Für die geringere Dichte PGP9.5-positiver NF bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC im Vergleich zu Patientinnen mit peritonealer EM konnte statistisch keine Signifikanz nachgewiesen werden (s. Abbildung 3 (B), s. Abbildung 4).

3.1.1.3 Gegenüberstellung der NF-Dichte der nahen Umgebung und der Peripherie

Vergleicht man die Dichte PGP9.5-positiver NF von Patientinnen mit peritonealer EM, so fällt auf, dass die Anzahl der NF in der unmittelbaren Umgebung der Läsion signifikant erhöht ist im Gegensatz zur Peripherie des Schnittes ($p < 0,01$). Betrachtet man die Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC so zeigt sich hier keine statistische Signifikanz (s. Abbildung 3 (C), siehe Abbildung 4).

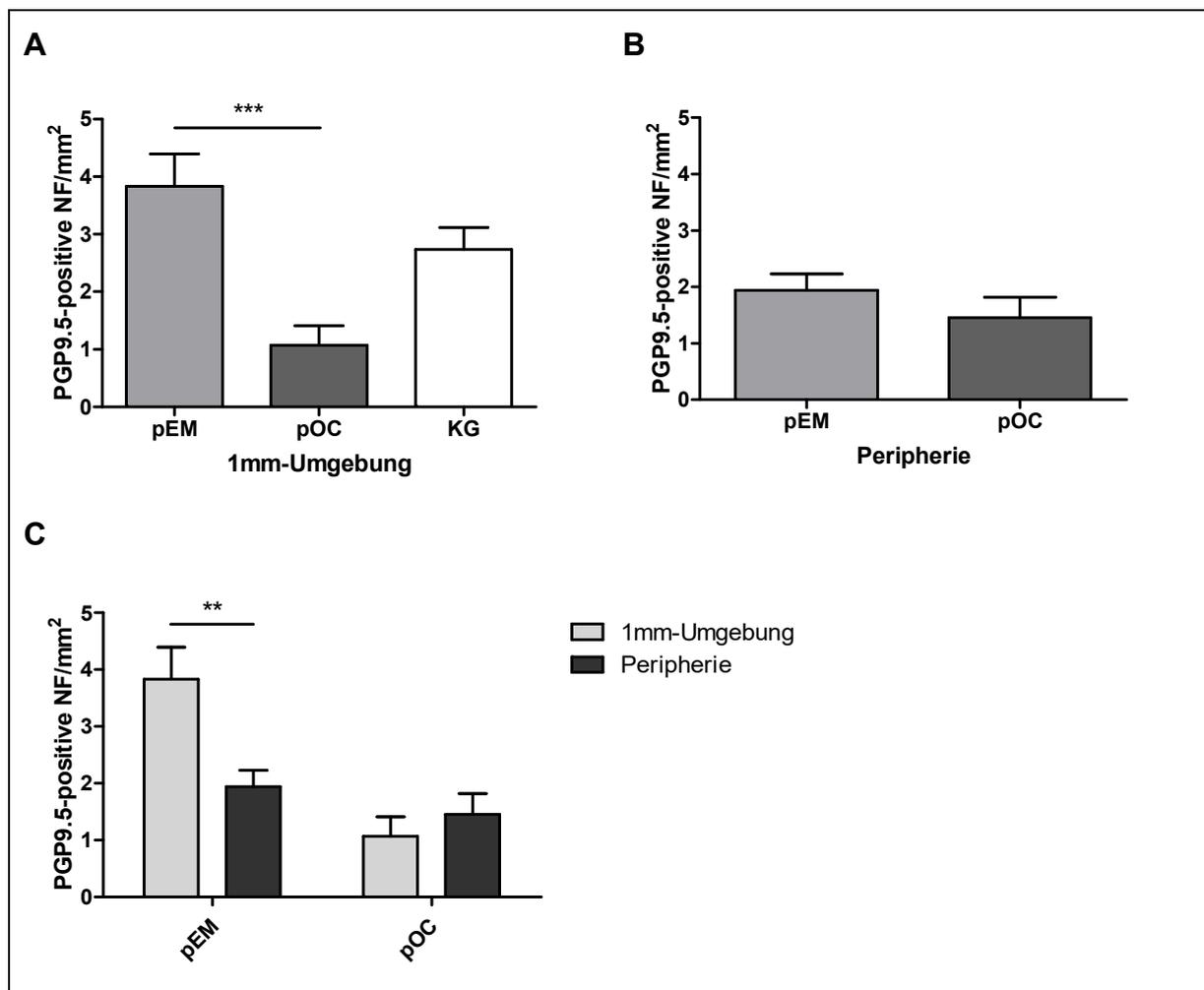


Abbildung 3: Grafische Darstellung der Nervenfaserdichte PGP9.5-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) NF-Dichte im 1mm-Abstand von pEM-Läsionen, von Tumorzellen bzw. der Lamina propria serosae gesunder Peritoneen, (B) NF-Dichte in der Peripherie von pEM und pOC, (C) Vergleich der NF-Dichte der 1mm-Umgebung und der Peripherie in pEM und pOC. Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

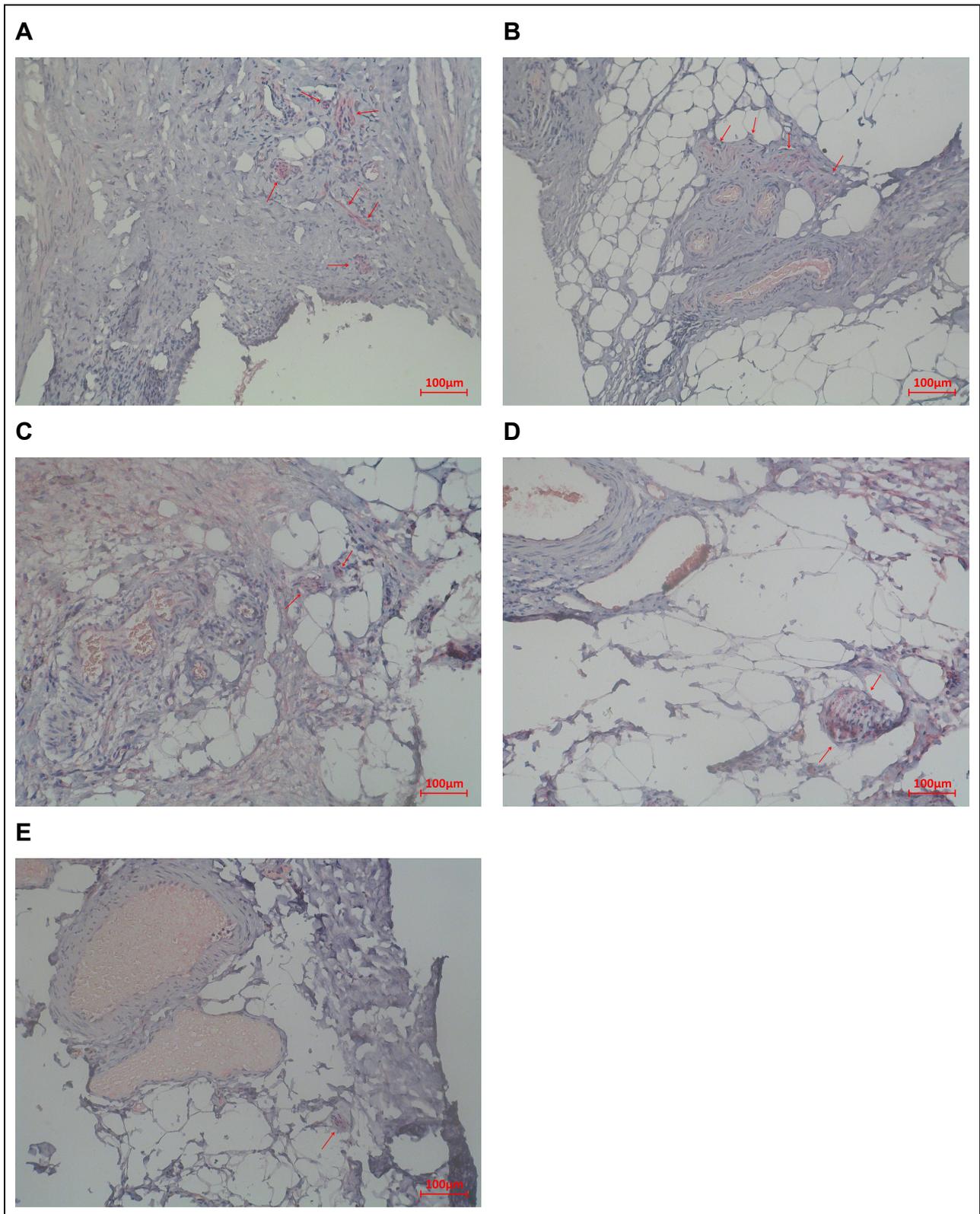


Abbildung 4: Bildliche Darstellung der Nervenfaserdichte PGP9.5-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) Epithel und Stroma einer pEM-Läsion, (B) Peripherie einer pEM-Läsion, (C) Tumorzellen und nahe Umgebung in pOC, (D) Peripherie in pOC, (E) Lamina propria serosae eines gesunden Peritoneums. Aufnahme der Bilder in 200-facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt, Pfeile markieren Nervenfaserschnitte.

3.1.2 Beurteilung sensibler Nervenfasern in peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

3.1.2.1 Beurteilung der sensiblen NF-Dichte in der nahen Umgebung

Um peritoneale EM-Läsionen (n=18) konnten im Abstand von 1mm im Mittel $1,94 \pm 1,73$ SP-positive NF/mm² gezählt werden und um die Peritonealkarzinose bei OC (n=15) $0,40 \pm 0,63$ SP-positive NF/mm². In den gesunden Peritoneen der KG (n=15) konnten $0,80 \pm 0,56$ SP-positive NF/mm² ermittelt werden. Die Dichte SP-positiver NF zeigte sich bei Patientinnen mit peritonealer EM signifikant erhöht gegenüber Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC ($p < 0,01$). Es konnte kein Unterschied in der Dichte SP-positiver NF von Patientinnen mit peritonealer EM sowie von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC im Vergleich zur KG ausgemacht werden (s. Abbildung 5 (A), s. Abbildung 6).

3.1.2.2 Beurteilung der sensiblen NF-Dichte in der Peripherie

In peritonealer EM (n=18) wurde in der Peripherie im Mittel eine Anzahl von $1,72 \pm 2,10$ SP-positiven NF/mm² ermittelt. In den Schnitten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC konnte in 11 von insgesamt 15 die NF-Dichte mit durchschnittlich $1,00 \pm 1,00$ SP-positiven NF/mm² bestimmt werden. Es konnten keine Unterschiede in der Dichte SP-positiver NF bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC im Vergleich zu Patientinnen mit peritonealer EM aufgezeigt werden (s. Abbildung 5 (B), s. Abbildung 6).

3.1.2.3 Gegenüberstellung der sensiblen NF-Dichte der nahen Umgebung und der Peripherie

Die in der Umgebung der peritonealen EM-Läsionen bestimmte Dichte SP-positiver NF unterschied sich nicht von der in der Peripherie. Bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC konnte ebenfalls keine statistische Signifikanz zwischen Umgebung und Peripherie festgestellt werden (s. Abbildung 5 (C), s. Abbildung 6).

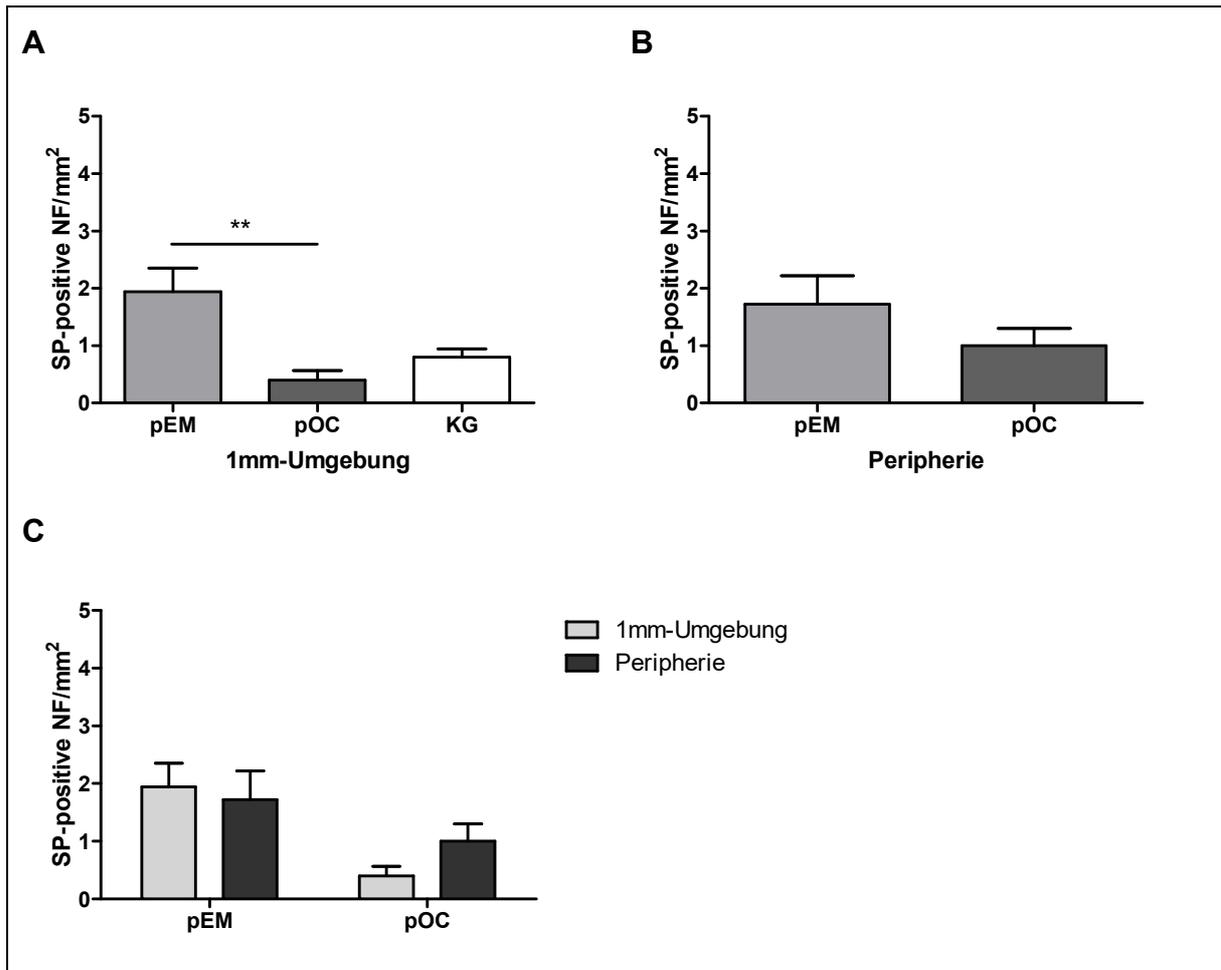


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Nervenfaserdichte SP-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) NF-Dichte im 1mm-Abstand von pEM-Läsionen, von Tumorzellen bzw. der Lamina propria serosae gesunder Peritoneen, (B) NF-Dichte in der Peripherie von pEM und pOC, (C) Vergleich der NF-Dichte der 1mm-Umgebung und der Peripherie in pEM und pOC. Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. **p < 0,01.

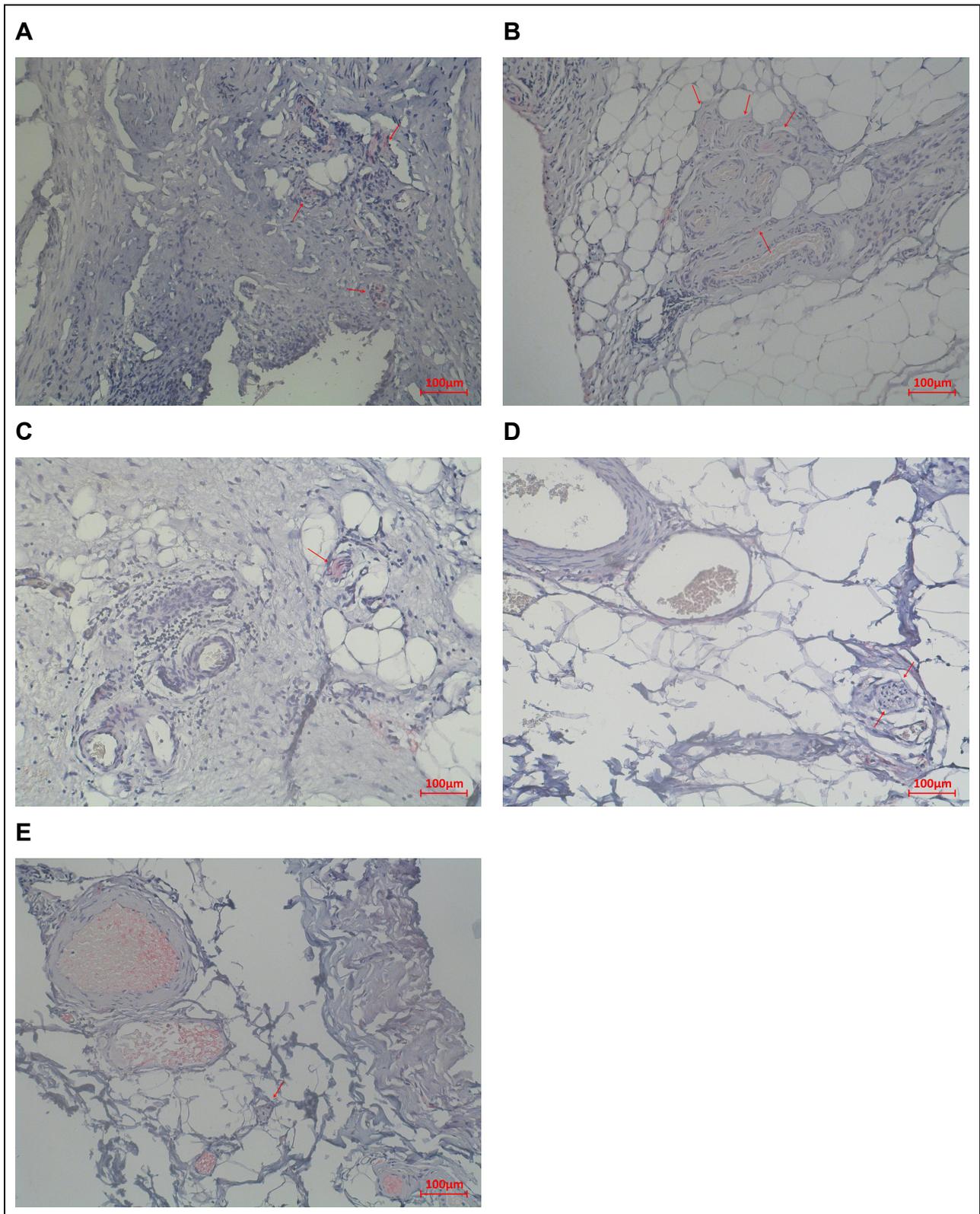


Abbildung 6: Bildliche Darstellung der Nervenfaserdichte SP-positiver Nerven in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) Epithel und Stroma einer pEM-Läsion, (B) Peripherie einer pEM-Läsion, (C) Tumorzellen und nahe Umgebung in pOC, (D) Peripherie in pOC, (E) Lamina propria serosae eines gesunden Peritoneums. Aufnahme der Bilder in 200-facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt, Pfeile markieren Nervenfaserschnitte.

3.2 Nachweis von Neurotrophinen

3.2.1 Vorkommen der Neurotrophine im Gewebe der peritonealen Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

3.2.1.1 Vorkommen von NGF

3.2.1.1.1 NGF-Expression in peritonealer Endometriose

Das Epithel der peritonealen EM-Läsionen (n=18) zeigte einen durchschnittlichen Flächen-Intensitäts-Score (FIS) von $173,61 \pm 97,12$ % für NGF. Das Stroma wies einen FIS von $55,83 \pm 59,81$ % und die Peripherie einen FIS von $11,11 \pm 13,78$ %. Für die KG (n=15) wurde ein mittlerer FIS von $14,8 \pm 24,67$ % ermittelt. Es konnte ein signifikant höherer FIS für NGF im Epithel nachgewiesen werden im Gegensatz zum Stroma ($p < 0,05$), der Peripherie ($p < 0,001$) und der KG ($p < 0,001$). Zudem war der FIS des Stromas signifikant höher als der der Peripherie ($p < 0,05$) und der KG ($p < 0,05$). Es lag kein signifikanter Unterschied in der Expression von NGF zwischen der KG und der Peripherie vor (s. Abbildung 7 (A); s. Abbildung 8).

3.2.1.1.2 NGF-Expression in Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom

Für NGF wiesen die Tumorzellen (n=15) einen FIS von $218 \pm 59,43$ % auf, die nahe Umgebung einen FIS von $53,00 \pm 32,06$ %. In 11 von 15 Schnitten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC konnte die Peripherie eindeutig abgegrenzt werden und ein mittlerer FIS von $10,00 \pm 9,22$ % ermittelt werden. In der KG (n=15) lag der FIS im Durchschnitt bei $14,8 \pm 24,67$ %. Der NGF-FIS der Tumorzellen zeigte sich signifikant erhöht gegenüber der nahen Umgebung ($p < 0,05$), der Peripherie ($p < 0,001$) und der KG ($p < 0,001$). Es konnte kein signifikanter Unterschied von NGF zwischen der nahen Umgebung der Tumorzellen, der Peripherie sowie der KG festgestellt werden (s. Abbildung 7 (B); s. Abbildung 8).

3.2.1.1.3 Vergleich der NGF-Expression in peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom

Peritoneale EM und Peritonealkarzinose bei OC exprimieren vergleichbar stark NGF. Das Epithel der peritonealen EM-Läsionen und die Tumorzellen der Peritonealkarzinose sowie das Stroma um die peritonealen EM-Läsionen und die nahe Umgebung der Tumorzellen sowie die Peripherie von pEM und pOC weisen einen ähnlichen FIS auf (s. Abbildung 7 (C), s. Abbildung 8).

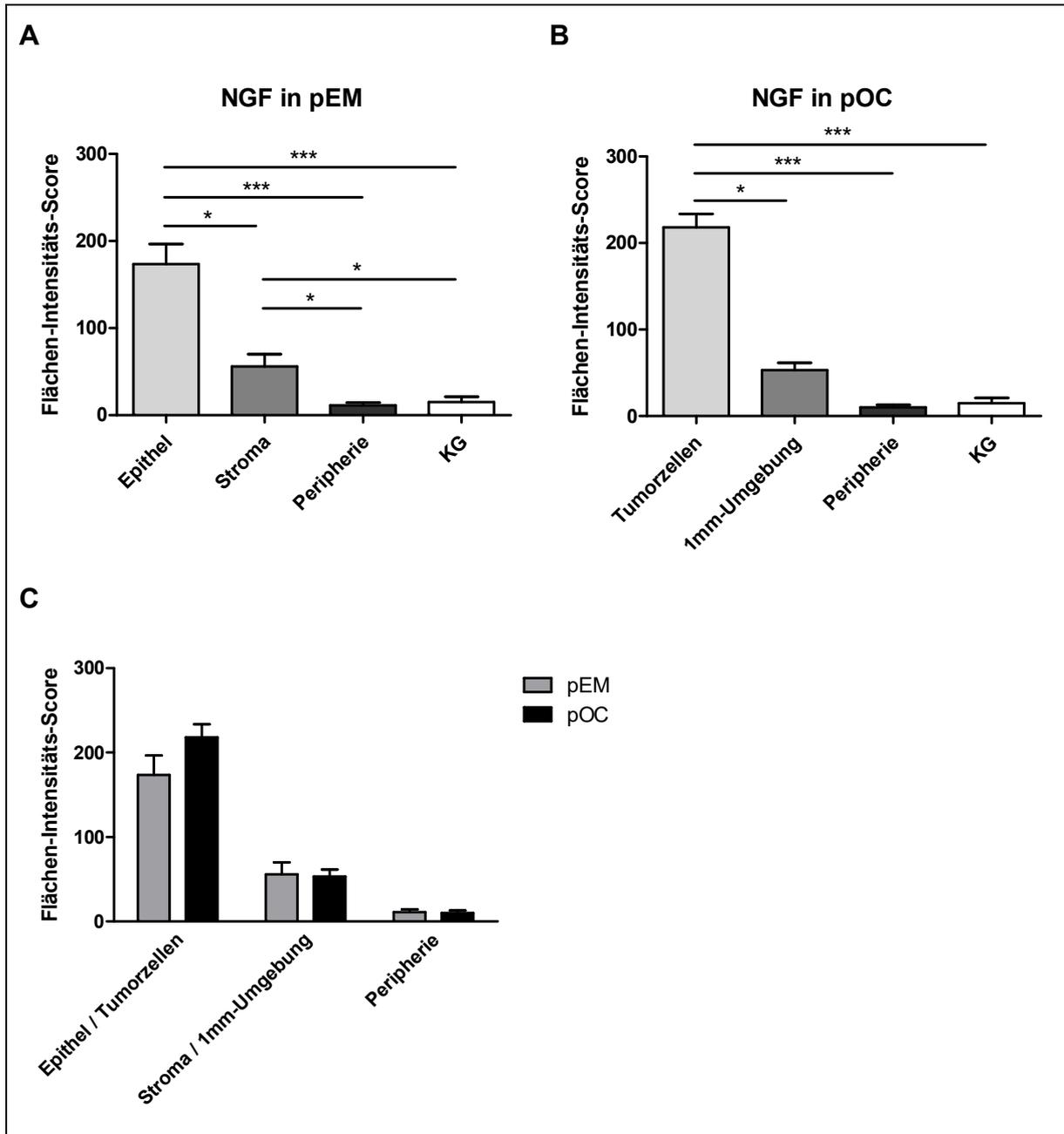


Abbildung 7: Grafische Darstellung der mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores bestimmten NGF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) FIS des Epithels, des Stromas und der Peripherie von pEM-Läsionen bzw. der Lamina propria serosae der gesunden Peritoneen, (B) FIS der Tumorzellen, der nahen Umgebung und der Peripherie von pOC bzw. der Lamina propria serosae der gesunden Peritoneen, (C) Vergleich des FIS des Epithels und der Tumorzellen, des Stromas und der nahen Umgebung sowie der Peripherie in pEM und pOC. Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

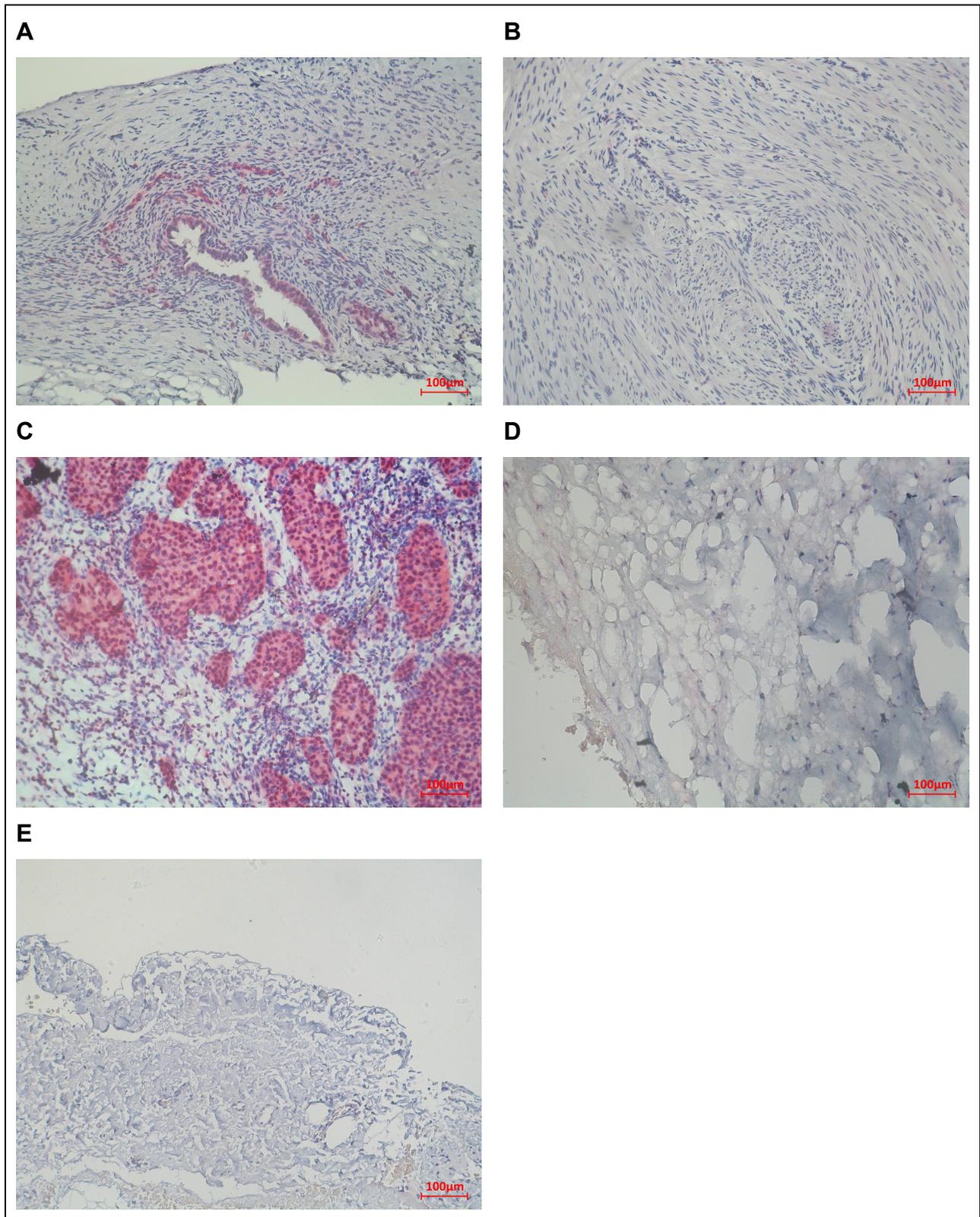


Abbildung 8: Bildliche Darstellung der NGF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) Epithel und Stroma einer pEM-Läsion, (B) Peripherie einer pEM-Läsion, (C) Tumorzellen und nahe Umgebung in pOC, (D) Peripherie in pOC, (E) Lamina propria serosae eines gesunden Peritoneums. Aufnahme der Bilder in 200-facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt.

3.2.1.2 Vorkommen von NT-3

3.2.1.2.1 NT-3-Expression in peritonealer Endometriose

Der Mittelwert des Flächen-Intensitäts-Score (FIS) für NT-3 lag für das Epithel der peritonealen EM-Läsionen (n=18) bei $128,06 \pm 86,33$ %, für das Stroma bei $56,67 \pm 40,44$ %, für die Peripherie bei $56,94 \pm 32,18$ % und in der KG (n=15) bei $112,33 \pm 66,03$ %. Es konnten signifikante Unterschiede in der Expression von NT-3 für den im Epithel höheren FIS im Gegensatz zum Stroma ($p < 0,01$) und zur Peripherie ($p < 0,01$) aufgezeigt werden, allerdings nicht zur KG. Zudem zeigten sich keine Unterschiede der FIS zwischen Stroma, Peripherie und KG (s. Abbildung 9 (A), s. Abbildung 10).

3.2.1.2.2 NT-3-Expression in Peritonealkarzinosen bei Ovarialkarzinom

Die Tumorzellen (n=15) zeigten einen durchschnittlichen FIS für NT-3 von $172 \pm 77,34$ %, die nahe Umgebung einen mittleren FIS von $41,33 \pm 32,32$ % auf. Insgesamt konnte in 11 von 15 Schnitten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC die Peripherie ausgewertet werden und ein durchschnittlicher FIS von $59,09 \pm 57,74$ % bestimmt werden. In der KG (n=15) lag der FIS bei $112,33 \pm 66,03$ %. Im Vergleich ist in den Tumorzellen signifikant mehr NT-3 exprimiert als in der nahen Umgebung ($p < 0,001$) und der Peripherie ($p < 0,001$), jedoch nicht im Vergleich zur KG. Zudem lag ein signifikanter Unterschied für den in der KG erhöhten FIS gegenüber der nahen Umgebung ($p < 0,05$) vor. Weitere Unterschiede im FIS zwischen Stroma, Peripherie und KG konnten nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 9 (B); s. Abbildung 10).

3.2.1.2.3 Vergleich der NT-3-Expression in peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom

Die Auswertung der Expression von NT-3 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Epithelzellen der peritonealen EM-Läsionen verglichen mit den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen, zwischen dem Stroma der peritonealen EM-Läsionen verglichen mit der nahen Umgebung der Tumorzellen sowie zwischen der Peripherie von pEM und pOC (s. Abbildung 9 (C), s. Abbildung 10).

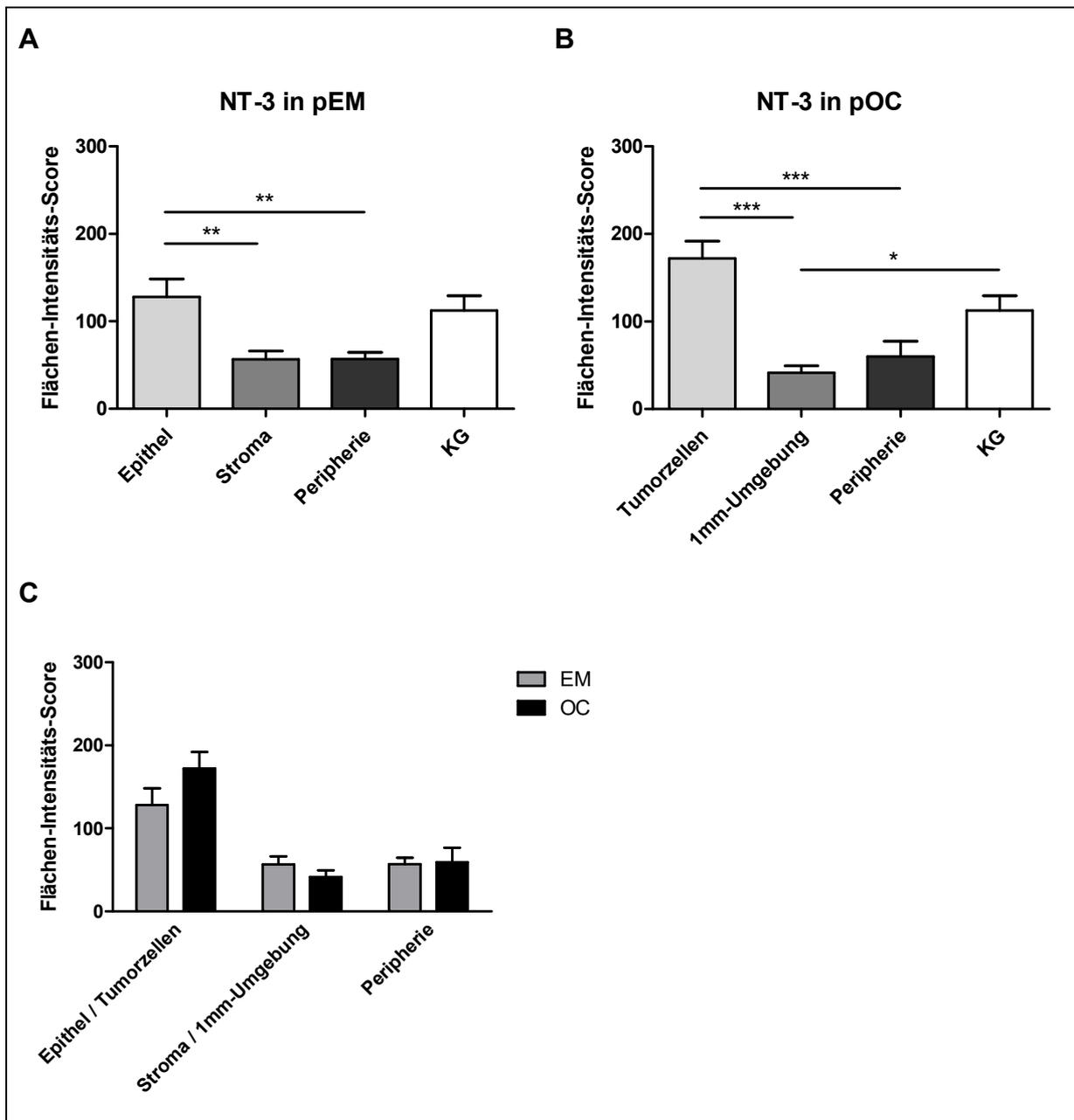


Abbildung 9: Grafische Darstellung der mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores bestimmten NT-3-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) FIS des Epithels, des Stromas und der Peripherie von pEM-Läsionen bzw. der Lamina propria serosae der gesunden Peritoneen, (B) FIS der Tumorzellen, der nahen Umgebung und der Peripherie von pOC bzw. der Lamina propria serosae der gesunden Peritoneen, (C) Vergleich des FIS des Epithels und der Tumorzellen, des Stromas und der nahen Umgebung sowie der Peripherie in pEM und pOC. Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

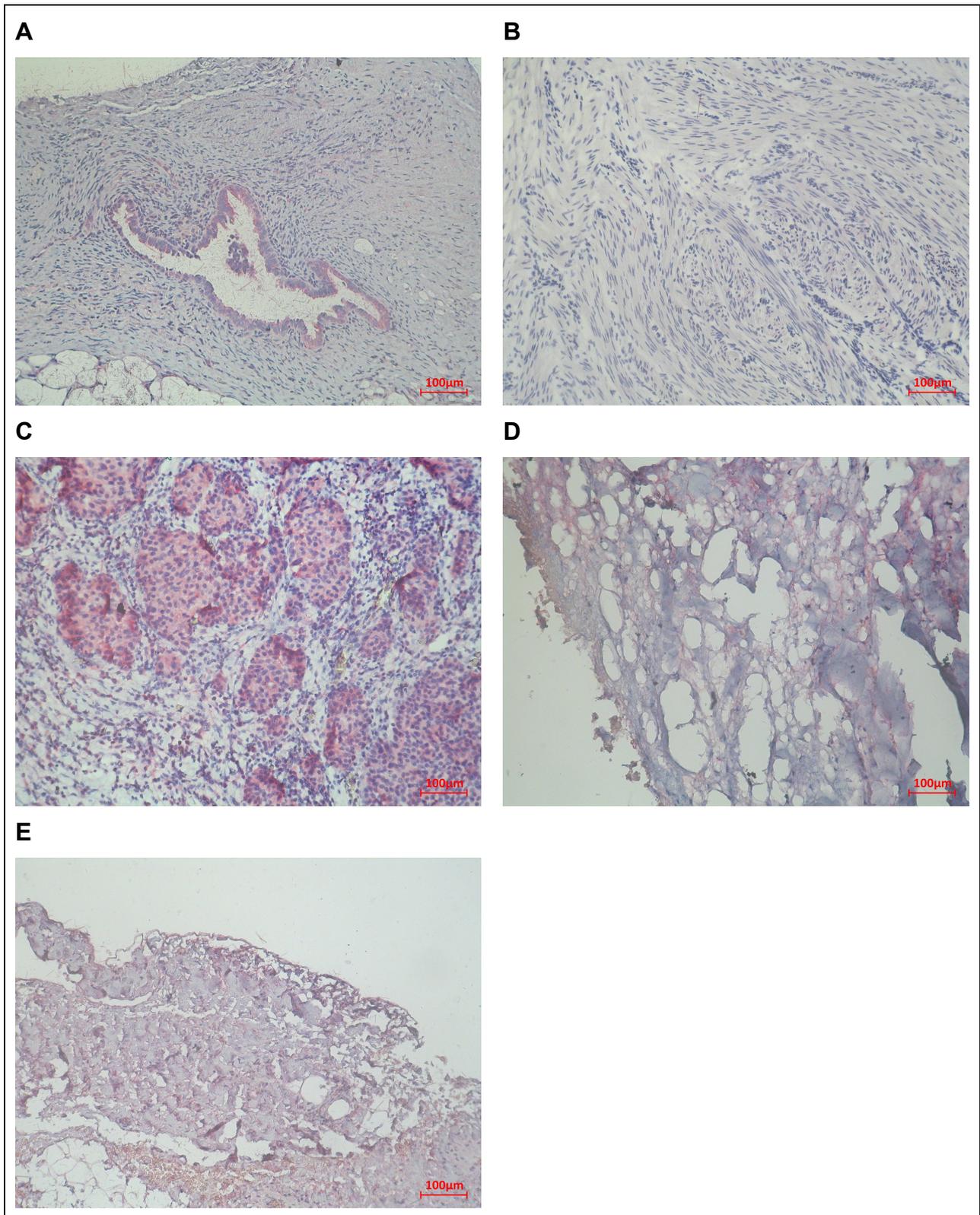


Abbildung 10: Bildliche Darstellung der NT-3-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) Epithel und Stroma einer pEM-Läsion, (B) Peripherie einer pEM-Läsion, (C) Tumorzellen und nahe Umgebung in pOC, (D) Peripherie in pOC, (E) Lamina propria serosae eines gesunden Peritoneums. Aufnahme der Bilder in 200-facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt.

3.2.1.3 Vorkommen von BDNF

3.2.1.3.1 BDNF-Expression in peritonealer Endometriose

Der Flächen-Intensitäts-Score (FIS) für BDNF betrug im Durchschnitt für das Epithel der peritonealen EM-Läsionen (n=18) $97,78 \pm 66,07$ %, für das Stroma $32,22 \pm 36,51$ % und für die Peripherie $25,56 \pm 24,67$ %. In der KG (n=15) lag der FIS im Mittel bei $10,00 \pm 12,39$ %. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen dem Epithel der peritonealen EM-Läsionen und der Peripherie ($p < 0,05$) sowie der KG ($p < 0,001$) festgestellt werden. Zwischen dem Epithel und dem Stroma sowie zwischen dem Stroma, der Peripherie und der KG konnten keine signifikant unterschiedlichen FIS für BDNF aufgezeigt werden (s. Abbildung 11 (A); s. Abbildung 12).

3.2.1.3.2 BDNF-Expression in Peritonealkarzinosen bei Ovarialkarzinom

Die Tumorzellen (n=15) wiesen einen mittleren FIS für BDNF von $182,67 \pm 61,7$ % und die nahe Umgebung einen FIS von $32,67 \pm 20,52$ % auf. In 11 von 15 Schnitten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC konnte die Peripherie mit einem FIS von $20,00 \pm 26,74$ % bewertet werden. Der FIS der KG (n=15) lag durchschnittlich bei $10,00 \pm 12,39$ %. In den Tumorzellen konnte im Vergleich zur nahen Umgebung ($< 0,001$), zur Peripherie ($< 0,001$) und zur KG ($< 0,001$) eine signifikant erhöhte Expression von BDNF nachgewiesen werden. Keine signifikanten Unterschiede lagen je zwischen der naher Umgebung, der Peripherie und der KG vor (s. Abbildung 11 (B); s. Abbildung 12).

3.2.1.3.3 Vergleich der BDNF-Expression in peritonealer Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom

Im Vergleich der Expression von BDNF zwischen dem Epithel der peritonealen EM-Läsionen und den Tumorzellen der Peritonealkarzinosen bei OC besteht ein signifikanter Unterschied, wobei in den Tumorzellen weitaus mehr BDNF exprimiert ist als in den Epithelzellen ($< 0,001$). Für das Stroma der peritonealen EM-Läsionen im Gegensatz zur nahen Umgebung der Tumorzellen sowie für die Peripherie von pEM und pOC konnten keine signifikanten Abweichungen ausgemacht werden (s. Abbildung 11 (C), s. Abbildung 12).

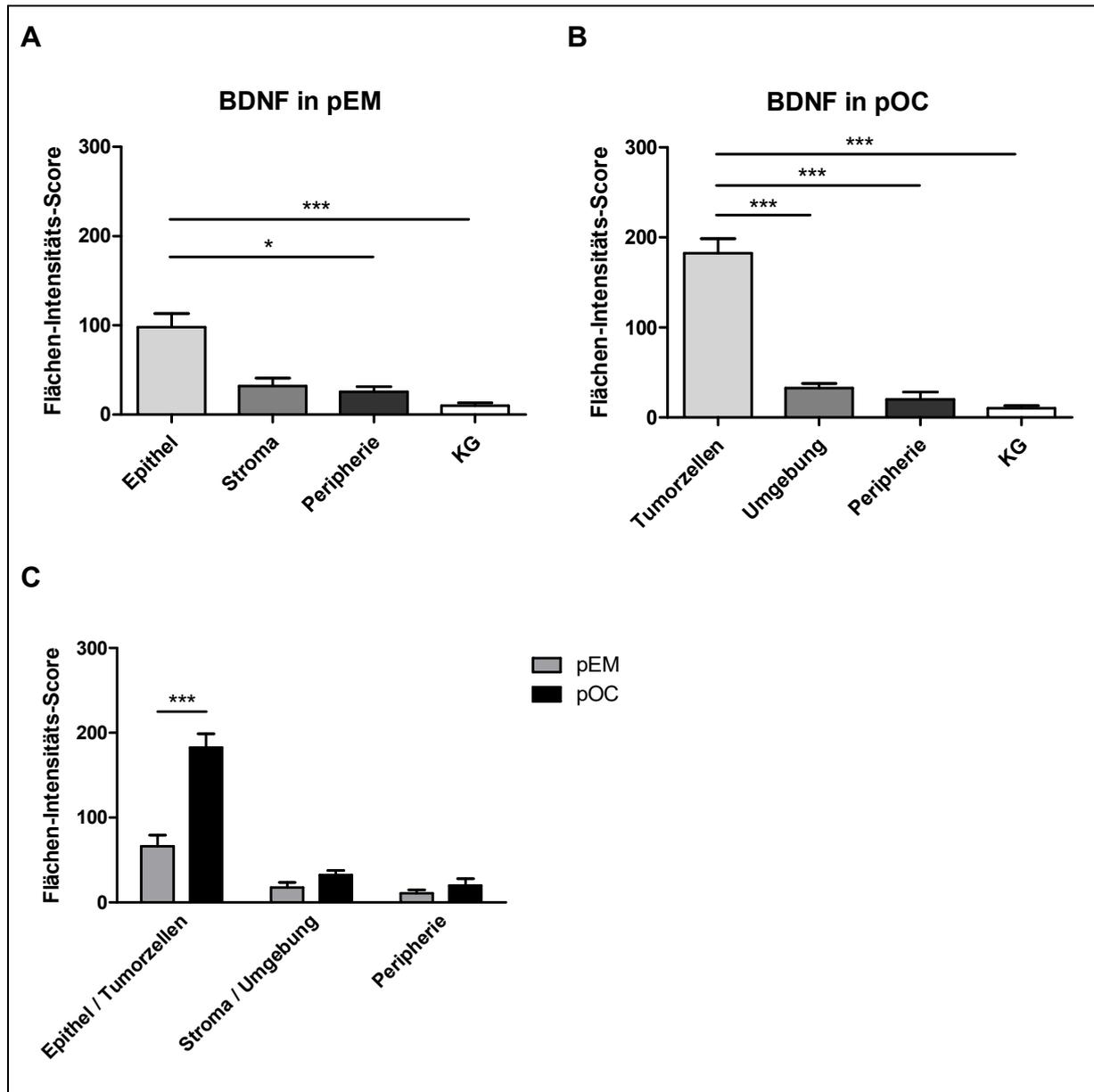


Abbildung 11: Grafische Darstellung der mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores bestimmten BDNF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) FIS des Epithels, des Stromas und der Peripherie von pEM-Läsionen bzw. der Lamina propria serosae der gesunden Peritoneen, (B) FIS der Tumorzellen, der nahen Umgebung und der Peripherie von pOC bzw. der Lamina propria serosae der gesunden Peritoneen, (C) Vergleich des FIS des Epithels und der Tumorzellen, des Stromas und der nahen Umgebung sowie der Peripherie in pEM und pOC. Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

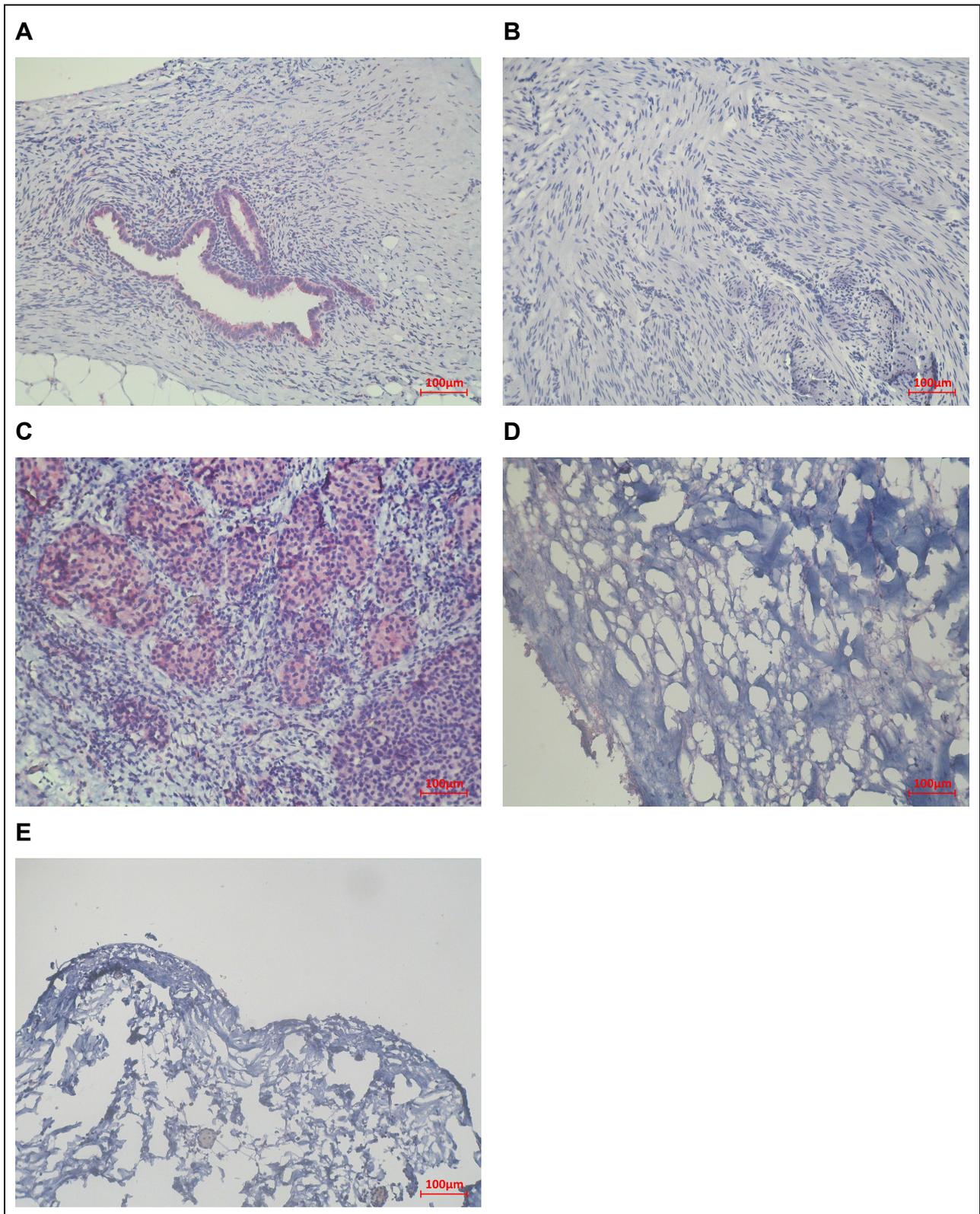


Abbildung 12: Bildliche Darstellung der BDNF-Expression in Gewebeschnitten von peritonealer Endometriose (pEM), Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und gesundem Peritoneum als Kontrollgruppe (KG).

(A) Epithel und Stroma einer pEM-Läsion, (B) Peripherie einer pEM-Läsion, (C) Tumorzellen und nahe Umgebung in pOC, (D) Peripherie in pOC, (E) Lamina propria serosae eines gesunden Peritoneums. Aufnahme der Bilder in 200-facher Vergrößerung. Ein Maßstabsbalken mit 100µm wurde eingefügt.

3.2.2 Vorkommen der Neurotrophine in Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten bei peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

Mittels Western Blot wurde die Mengen an NGF (27 kDa), NT-3 (35kDa) und BDNF (27,8 kDa) in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer EM (n=23), von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC (n=25) und der KG (n=20) gemessen. In der semiquantitativen Auswertung konnten zwischen den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den relativen Konzentration von NGF, NT-3 bzw. BDNF festgestellt werden (s. Tabelle 6, s. Abbildung 13, s. Abbildung 14).

Tabelle 6: Zusammenfassung der relativen Konzentrationen der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG).

Es ist jeweils der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) angegeben.

	pEM		pOC		KG	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
NGF	1,01	0,40	0,95	0,40	1,00	0,32
NT-3	0,88	0,30	0,84	0,29	1,00	0,29
BDNF	0,89	0,44	0,80	0,17	1,00	0,34

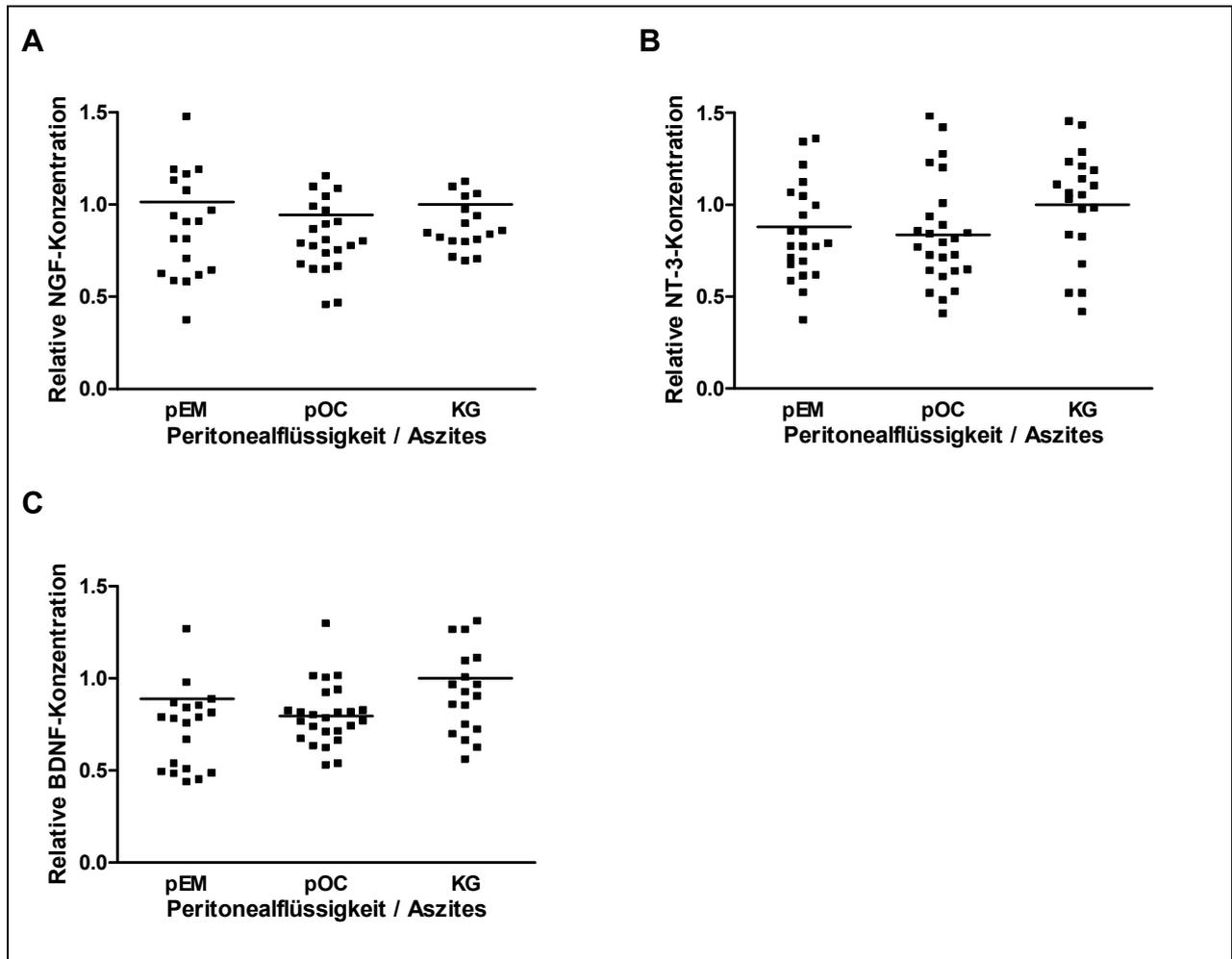


Abbildung 13: Grafische Darstellung der relativen Konzentrationen der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG).

(A) relative NGF-Konzentration, (B) relative NT-3-Konzentration, (C) relative BDNF-Konzentration in den PF bzw. AF von pEM, pOC und der KG. Die Werte sind einzeln in einer Punktwolke dargestellt. Es ist jeweils der Mittelwert abgebildet.

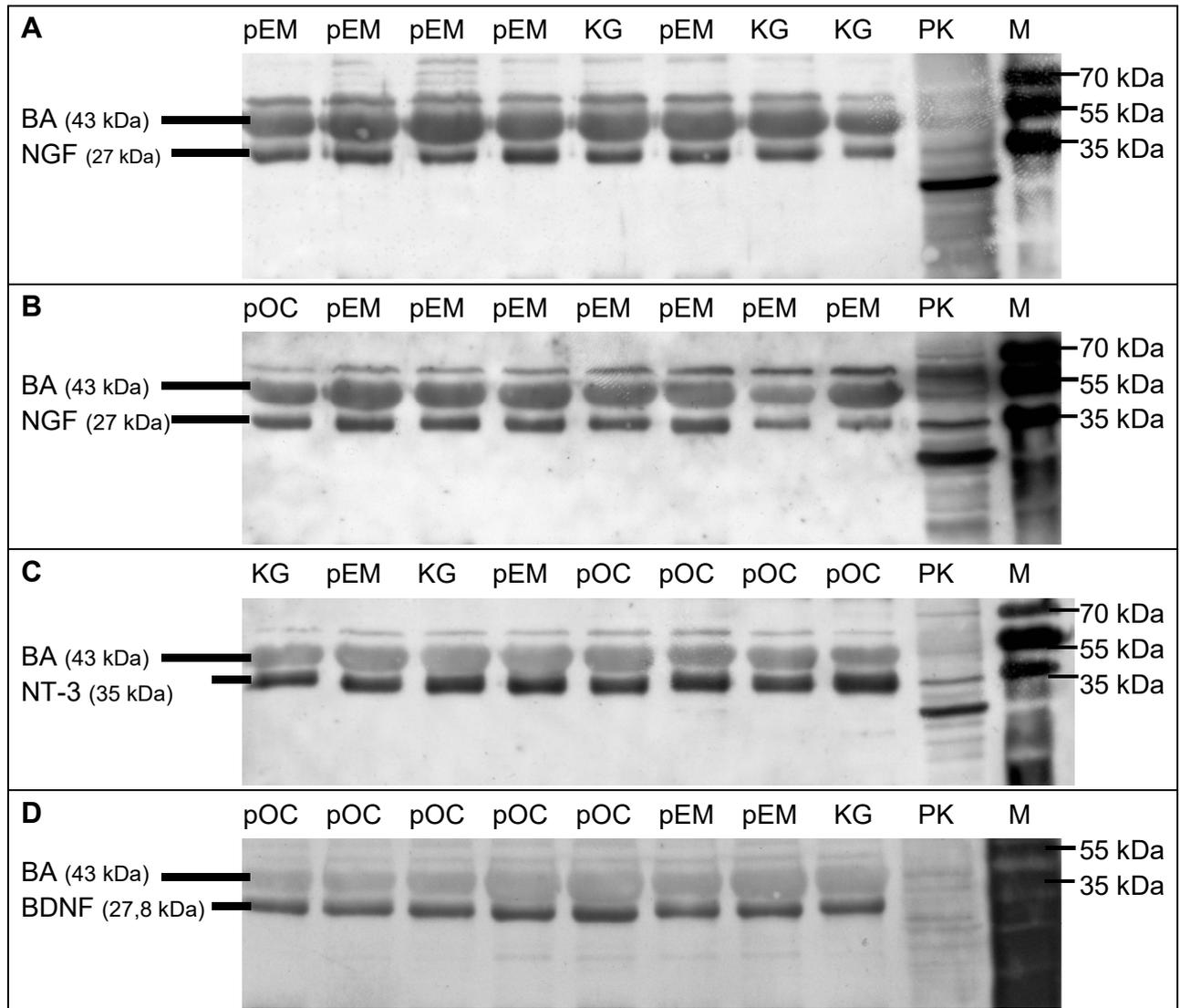


Abbildung 14: Exemplarische bildliche Darstellung der Western Blot-Banden der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF sowie des Beta-Aktin in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG).

Banden der mittels Western Blot in den PF bzw. AF nachgewiesenen Neurotrophine (A,B) NGF mit 27 kDa, (C) NT-3 mit 35 kDa und (D) BDNF mit 27,8 kDa sowie des „house keeping“-Proteins Beta-Aktin (BA) mit 43 kDa. Als Marker (M) zur Ermittlung der Molekülmassen wurde eine Proteinleiter genutzt, als Positivkontrolle (PK) die Östrogen-sensitive MCF-7 Brustkrebs-Zelllinie.

3.3 Bestimmung der Östrogenkonzentration in Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten bei peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

Die Östrogenkonzentration in den PF bzw. AF betrug bei Patientinnen mit peritonealer EM (n=21) im Durchschnitt $5185,6 \pm 17232,4$ pmol/l, bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC (n=21) $77,8 \pm 32,2$ pmol/l und in der KG (n=13) $1325,2 \pm 1866,73$ pmol/l. Es fiel auf, dass die einzelnen Östrogenwerte innerhalb der drei Gruppen sehr weit auseinander lagen, was auch die hohen Standardabweichungen erklärt.

Im Vergleich der drei Gruppen zeigte sich, dass signifikant weniger Östrogen bei Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC vorlag im Gegensatz zu Patientinnen mit peritonealer EM ($p < 0,001$) und zu Patientinnen der KG ($p < 0,001$). Auch wurde ersichtlich, dass bei Patientinnen mit peritonealer EM eine erhöhte Östrogenkonzentration in den PF vorlag entgegen den Patientinnen aus der KG, dennoch konnte hierfür keine statistische Signifikanz aufgezeigt werden (s. Abbildung 15).

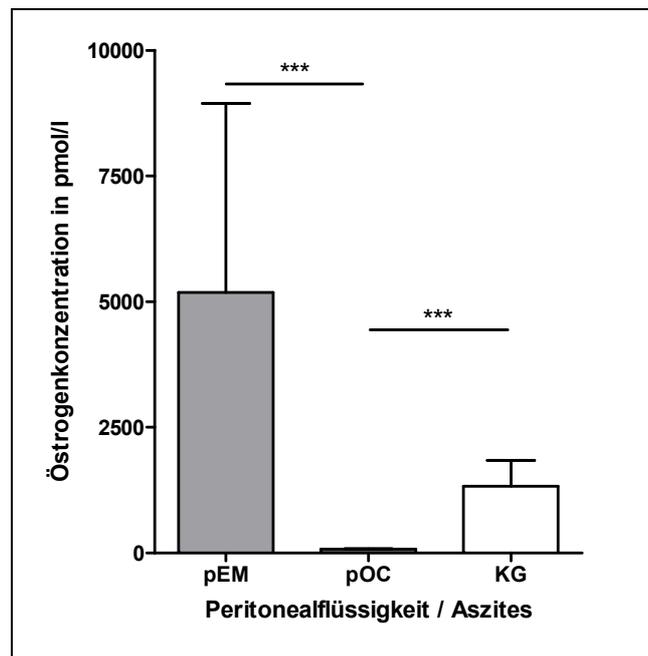


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Östrogenkonzentrationen in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG).

Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. *** $p < 0,001$.

3.4 Beurteilung neurotropher Eigenschaften von Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten bei peritonealer Endometriose und der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms

Im neuronalen Wachstums-Assay wurde die Nervenaussprossung sensibler Hühnerembryoganglien mithilfe des Nervenwachstumsscores (NWS) beurteilt. Hier zeigte sich eine signifikant verminderte Aussprossung der Negativkontrolle (NK) im Vergleich zur Positivkontrolle (PK, $p < 0,05$), zur pEM ($n=12$, $p < 0,01$) und zur pOC ($n=24$, $p < 0,01$), jedoch nicht zur KG ($n=12$). Es konnten keine weiteren signifikanten Unterschiede aufgezeigt werden, jedoch stellte sich die Aussprossung sensibler Ganglien in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer EM und Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei OC vergleichbar mit der PK dar. Die Aussprossung der KG hingegen erscheint dazu im Trend erniedrigt (s. Tabelle 7, s. Abbildung 16, s. Abbildung 17).

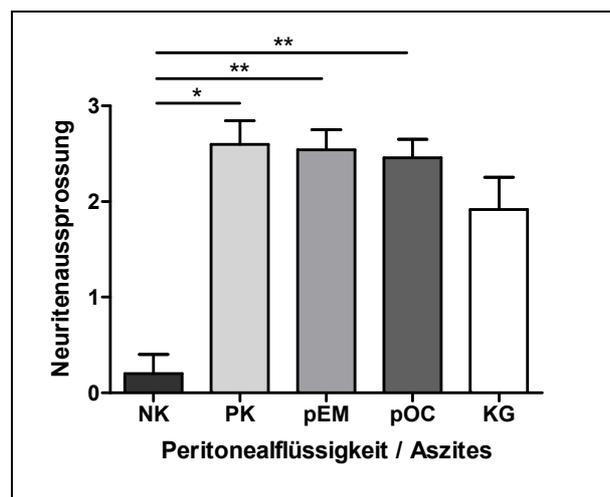


Abbildung 16: Grafische Darstellung der mithilfe des NWS beurteilten Neuritenausprossung sensibler Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG).

Mit aufgeführt sind die Positivkontrollen (PK) und Negativkontrollen (NK).

Es ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung abgebildet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tabelle 7: Zusammenfassung der mithilfe des NWS beurteilten Neuritenausprossung sensibler Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrollgruppe (KG). Es ist jeweils der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) angegeben.

	NK		PK		pEM		pOC		KG	
	MW	SD								
sensibel	0,20	0,45	2,60	0,55	2,54	0,72	2,46	0,94	1,92	1,17

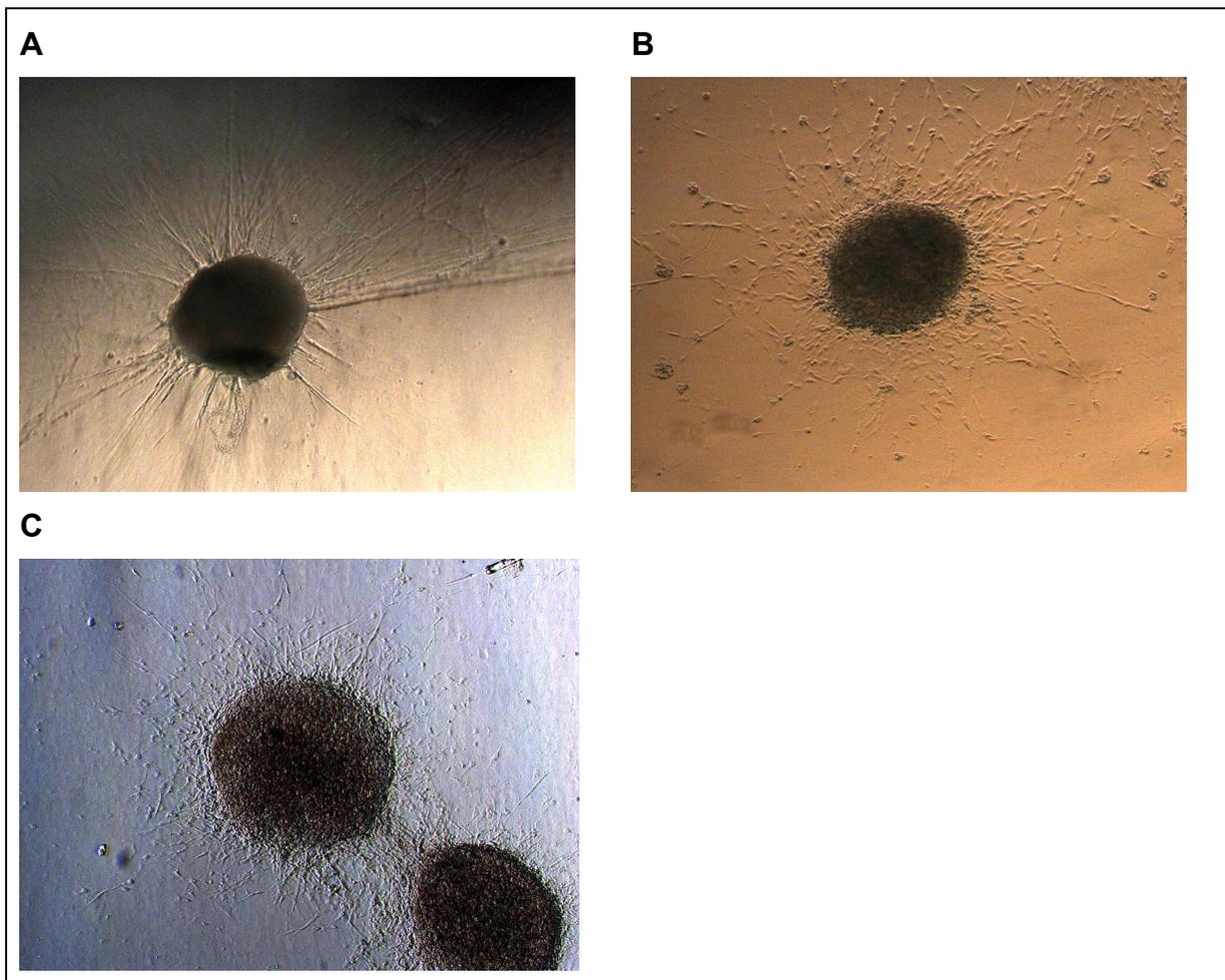


Abbildung 17: Exemplarische bildliche Darstellung der Neuritenausprossung aus sensiblen Hühnerembryoganglien inkubiert in den PF bzw. AF von Patientinnen mit peritonealer Endometriose (pEM), mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom (pOC) und der Kontrolle (KG).

Neuritenausprossung aus sensiblen Hühnerembryoganglien inkubiert in PF bzw. AF von (A) Frauen mit pEM, (B) Frauen mit pOC und (C) der KG.

4 DISKUSSION

Das Peritoneum als größte seröse Membran des Körpers kleidet die Peritonealhöhle aus. Als physikalische Barriere, aber auch mithilfe von Immunzellen, schützt es umliegende Organe und Strukturen vor Fremdeinwirkung. Die vom Peritoneum gebildete Peritonealflüssigkeit reduziert die Reibung zwischen dem parietalen und dem viszeralen Blatt. Das parietale Blatt des Peritoneums wird somatosensibel innerviert, das viszerale Blatt autonom [1]. Verschiedene Erkrankungen betreffen das Peritoneum, wobei es zu Schmerzen kommen kann. Über mögliche schmerzpathogenetische Mechanismen ist hierbei bislang wenig bekannt. Für einige Erkrankungen des Peritoneums könnten Kenntnisse dieser Mechanismen von großer klinischer Bedeutung sein, da über ein besseres Verständnis der Pathogenese die gezielte Entwicklung therapeutischer Strategien möglich werden kann.

In dieser Arbeit wurden die peritoneale Endometriose und die Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms erstmals in Bezug auf ihre Schmerzsymptomatik sowie die Schmerzpathogenese miteinander verglichen. Die typischerweise schmerzhaft verlaufende Endometriose des Peritoneums, und die trotz fortgeschrittenem Stadium meist nur mit geringen Schmerzen verlaufende Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms, stehen sich als gynäkologische Erkrankungen mit Beteiligung des Peritoneums gegenüber. Die Schmerzpathogenese der Endometriose gibt beständig Anlass zur Forschung, wobei die Untersuchung von Nervenfasern und Neurotrophinen von wesentlicher Bedeutung ist.

Hier wurde nun die Gesamtnervenfaserdichte (PGP9.5) im Gewebe sowie die sensorische Nervenfaserdichte (SP) bestimmt und für beide Erkrankungen vergleichend ausgewertet. Um den möglichen Einfluss von Signalstoffen auf das Nervenwachstum in beiden Erkrankungen besser einordnen zu können, wurde die Expression der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF sowohl im Gewebe als auch in den Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten untersucht. Weiterhin wurden die neuromodulatorischen Eigenschaften von Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten beurteilt. Dazu wurden sensible Hinterwurzelganglien in den Flüssigkeiten inkubiert und deren Aussprossen analysiert. Zudem wurde die Östrogenkonzentration in den Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten bestimmt.

4.1 Innervation

Für die Endometriose werden Nervenfasern als bedeutender Faktor in der Entstehung von Schmerz angenommen. Insbesondere die im peripheren Gewebe befindlichen freien Nervenendigungen sensibler Nervenfasern dienen der Schmerzweiterleitung ins Zentralnervensystem. Die Sensitivierung und Aktivierung dieser Nerven erfolgt über proinflammatorische Mediatoren, welche im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse in der Umgebung von Endometrioseläsionen gefunden werden [35-37]. Zudem wird zum einen ein Einfluss von Östrogen sowie NGF auf das Entzündungsgeschehen, zum anderen auch direkt auf sensible Nervenfasern angenommen [38, 39, 60-62]. Hierüber lässt sich ein Beteiligtsein von Nervenfasern an der Schmerzpathogenese in Endometriose annehmen.

In dieser Arbeit wurde die Gesamtdichte PGP9.5-positiver Nervenfasern untersucht. Hier konnte kein Unterschied im Gewebe um die peritonealen Endometrioseläsionen im Vergleich zu gesunden Peritoneen aufgezeigt werden. Allerdings stellte sich die Nervenfaserdichte in der nahen Umgebung der Endometrioseläsion erhöht dar im Vergleich zur Peripherie der Läsion. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Arnold et al. [66]. Im Gegensatz dazu konnten Tokushige et al. in ihrer Untersuchung, bei gleicher Methode aber höherer Fallzahl, eine erhöhte Nervenfaserdichte in der direkten Umgebung der Endometrioseläsionen aufzeigen [63]. Untersuchungen in anderen Endometrioseformen zeigten untereinander Unterschiede in der Nervenfaserdichte. Die tiefinfiltrierende Endometriose ist die Unterform der Endometriose, die mit besonders starken Schmerzen einhergeht [105]. Auch die Nervenfaserdichte erwies sich als signifikant höher im Vergleich zur peritonealen Endometriose [106]. Es ist demnach denkbar, dass die Anzahl der Nervenfasern mit der Stärke der Schmerzen korreliert. Für die peritoneale Endometriose wurde ein solcher Zusammenhang in einer Pilotstudie belegt [64].

Weiterführend wurde die Dichte sensorischer SP-positiver Nervenfasern bestimmt. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten sensible Nervenfasern in peritonealer Endometriose nachweisen, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Nervenfaserdichte im Vergleich zu den gesunden Peritoneen der Kontrollgruppe. Nur wenige Studien untersuchten bislang die sensible Nervenfaserdichte in peritonealer Endometriose. Tokushige et al. konnten sensible Nervenfasern immunhistochemisch demonstrieren, konnte aber ebenfalls keinen Unterschied zu gesunden Peritoneen finden [63]. Andere Veröffentlichungen hingegen konnten verglichen mit der Kontrollgrup-

pe signifikant mehr sensible Nervenfasern in der Umgebung peritonealer Endometrioseläsionen auffinden [66, 69]. Insgesamt ist die gegenwärtige Datenlage zur Innervation der peritonealen Endometriose unzureichend und es bedarf größer angelegter Studien, um eine mögliche Beteiligung von Nervenfasern an der Schmerzpathogenese zuverlässig bestätigen zu können.

Bei der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms finden sich zahlreiche im Peritoneum verteilte Tumorknötchen. Die Peritonealkarzinose entsteht durch intraperitoneale Dissemination von Tumorzellen und ist in der Regel mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert. Trotz der ausgeprägten Verteilung im Peritoneum sind die klinischen Beschwerden der Patienten wenig stark und spezifisch [99]. Vorausgesetzt Nervenfasern haben einen Einfluss auf die Schmerzentstehung in peritonealer Endometriose, so sollten demnach im Gegensatz dazu in der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms kaum Nervenfasern zu finden sein. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Interessanter Weise war die Gesamtnervenfasernzahl als auch die sensible Nervenfaserdichte in der Umgebung der Tumorzellen signifikant niedriger als um die peritonealen Endometrioseläsionen und die gesunden Peritoneen. Bislang liegen keine wissenschaftlichen Untersuchungen zum Vorkommen von Nervenfasern in der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms zum Vergleich vor. Möglicherweise ist die Reduktion der peritonealen Innervation im höheren Alter aber auch physiologisch, weshalb die Nervenfaserdichte im Peritoneum gesunder postmenopausaler Patientinnen weiterführend untersucht werden sollte.

Im Rückschluss könnte die höhere Nervenfaserdichte die Schmerzentstehung in peritonealer Endometriose gut erklären. Die Mechanismen, welche zur Erhöhung oder Reduktion der Nervenfaserdichte beitragen, sind nach wie vor unbekannt. In der Endometrioseforschung sind hier die Neurotrophine von besonderem Interesse.

4.2 Neurotrophine

Neurotrophine sind Signalfaktoren des Nervensystems und sind wichtig für Überleben, Wachstum und Funktion von Nervenzellen. Für die Endometriose werden Neurotrophine und allen voran ihr Hauptvertreter NGF als bedeutend angesehen. Ein Einfluss auf das Neueinsprossen von Nervenfasern als auch ein Beteiligtsein im Rahmen von Entzündungsreaktionen wird angenommen und könnte zur Entstehung von Schmerz in Endometriose beitragen.

In dieser Arbeit wurden sowohl NGF als auch NT-3 und BDNF untersucht und ihre Expression im endometriotischen Gewebe mithilfe des Flächen-Intensitäts-Scores als auch semiquantitativ in den Peritonealfüssigkeiten als relative Konzentrationen beurteilt. Alle drei Neurotrophine konnten im Gewebe nachgewiesen werden. Dabei wies das Epithel der peritonealen Endometrioseläsion die höchste Expression auf, in der Peripherie hingegen lagen alle Neurotrophine signifikant vermindert vor. Zudem erwiesen sich im Epithel der Läsion NGF und BDNF erhöht exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch nicht NT-3. Es kann daher vermutet werden, dass vordringlich NGF und BDNF in peritonealer Endometriose neuromodulatorisch wirken. In den Peritonealfüssigkeiten konnten NGF, NT-3 und BDNF ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings konnte kein relativer Konzentrationsunterschied zueinander als auch zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Verschiedene Studien untersuchten bislang die Expression der Neurotrophine in peritonealer Endometriose. Im Gewebe konnte NGF hierbei in der Immunhistochemie und der real-time Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR) nachgewiesen werden [63, 107]. Auch in den Peritonealfüssigkeiten von Patientinnen mit peritonealer Endometriose lag NGF gegenüber der Kontrollgruppe in der Analyse mittels Western Blot vermehrt vor [85]. Für NT-3 und BDNF gibt es deutlich weniger Daten. In einer Untersuchung konnte in peritonealen Endometrioseläsionen eine schwache NT-3-Expression im Epithel gesehen werden [65]. Eine andere Studie konnte alle Neurotrophine vermehrt in ovarieller Endometriose nachweisen [84]. Insgesamt ist die Datenlage inkongruent. Verschiedene Studiendesigns mit Verwendung unterschiedlicher Gewebeproben und Nachweismethoden macht die Vergleichbarkeit der publizierten Daten schwierig. Für NGF liegen generell die meisten Untersuchungen vor. Das Beteiligtsein von NGF an der Pathogenese der Endometriose kann daher begründet angenommen werden und wird auch durch diese Arbeit unterstützt. Für NT-3 und BDNF hingegen ist eine solche Aussage zu diesem Zeitpunkt trotz einiger Hinweise nicht möglich.

Wie bereits erwähnt sind Neurotrophine wichtig für Nervenzellen, allen voran sensible Nervenzellen. NGF fördert das Wachstum von sensiblen Nervenfasern, sichert ihr Fortbestehen, repariert und schützt sie vor schädlichen Einflüssen. Aber NGF unterhält nicht nur die Nervenfasern, es bewirkt über Mediatoren wie Substanz P auch eine Aktivierung und Sensitivierung sensibler Nervenfasern und trägt damit zur Entstehung von Schmerz bei [38, 39]. So konnte in Peritonealfüssigkeiten von Patientinnen mit peritonealer sowie ovarieller Endometriose mit zunehmender NGF-Menge auch eine kli-

nisch stärkere Ausprägung der Schmerzen beobachtet werden [107]. In zahlreichen Experimenten an Tieren konnte ein Einfluss von NGF auf die Entstehung von Schmerz dokumentiert werden [75]. Auch in einer Studie an gesunden Probanden steigerte sich die Schmerzempfindlichkeit nach intramuskulärer Injektion von NGF und eine Schmerzüberempfindlichkeit konnte über mehrere Tage hinweg nachgewiesen werden [108]. Zudem wurde eine Beteiligung von NGF an chronischen Entzündungsreaktionen festgestellt. NGF beeinflusst Immunzellen und kann so die Produktion und Freisetzung von Immunmediatoren triggern. Auf diese Weise unterhält NGF die Entzündung [40, 41]. Aber auch BDNF scheint auf Entzündungsreize hin vermehrt synthetisiert zu werden. Überdies kann NGF die Synthese von BDNF induzieren [78, 80-82]. Die peritoneale Endometriose wird zunehmend als chronisch entzündliche Erkrankung verstanden. Es konnten vermehrt Immunzellen wie Makrophagen in der Umgebung endometriotischer Läsionen nachgewiesen werden [28]. Immunzellen wiederum sezernieren proinflammatorische Mediatoren. Diese Mediatoren können direkt und auch indirekt über die Freisetzung von NGF sensible Nervenfasern sensitivieren und damit Schmerzen verursachen [38, 39, 76, 79].

Auch im Gewebe der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms sowie den Aszitesflüssigkeiten konnten Neurotrophine nachgewiesen werden, wobei insgesamt ähnliche Expressionsmuster wie bei der peritonealen Endometriose gesehen wurden. Im Gewebe konnte in den Tumorzellen eine deutlich gesteigerte Expression aller Neurotrophine gesehen werden, die sich im Vergleich zur Peripherie signifikant erhöht darstellt. Für NGF und BDNF konnten ebenfalls signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Die Flächen-Intensitäts-Scores der Neurotrophine erwiesen sich zwischen der Peritonealkarzinose und der peritonealen Endometriose als miteinander vergleichbar. Lediglich BDNF konnte in den Tumorzellen der Peritonealkarzinose signifikant höher exprimiert als in den Epithelzellen der peritonealen Endometrioseläsionen nachgewiesen werden. In den Aszitesflüssigkeiten waren NGF, BDNF und NT-3 vorhanden, allerdings gab es keine Unterschiede in den relativen Konzentrationen von peritonealer Endometriose, Peritonealkarzinose und der Kontrollgruppe.

Die dokumentierte geringe Nervenfaserdichte der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms scheint im Unterschied zur peritonealen Endometriose durch die nachgewiesenen Neurotrophine nicht beeinflusst zu werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Untersuchungen zur Neurotrophinexpression in der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms, allerdings konnten NGF sowie BDNF in

Tumorzellen des Ovarialkarzinoms aufgezeigt werden [109-111]. NGF wird eine bedeutende Rolle in der Tumor-induzierten Angiogenese zugeschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass NGF über seinen Rezeptor TrkA direkt und indirekt über die hochregulierte Expression des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) die Neubildung von Gefäßen im Ovarialkarzinom stimuliert [109, 112]. Die Angiogenese ist essentiell für das Tumorwachstum. Auch BDNF könnte über VEGF die Angiogenese induzieren. Für andere Tumoren, wie das Neuroblastom und das Chondrosarkom, wurde dies bereits untersucht [113, 114]. NGF wird über seinen Rezeptor TrkA ebenso eine Rolle im Tumorwachstum und der Metastasierung zugeschrieben. Untersuchungen, unter anderem durchgeführt am Mammakarzinom, lassen einen solchen Einfluss vermuten [115, 116]. BDNF ist zwar sowohl im gesunden Ovar als auch im Ovarialkarzinom vorhanden, jedoch ist sein Rezeptor TrkB nur in den Tumorzellen des Ovarialkarzinoms erhöht exprimiert. TrkB ist hierbei mit einer gesteigerten Aggressivität des Tumors und einer schlechteren Prognose assoziiert. Der BDNF-TrkB-Signalweg unterdrückt in Tumorzellen die Anoikis, die Apoptose von Zellen ohne Matrix-Kontakt. Aus dem Zellverband gelöste Tumorzellen könnten so den programmierten Zelltod umgehen und metastasieren. BDNF und TrkB konnten in metastasierten Ovarialkarzinomzellen des Omentum majus sowie in Tumorsphäroiden in Aszites bei Ovarialkarzinom vermehrt nachgewiesen werden. Der BDNF-TrkB-Signalweg könnte somit an der peritonealen Dissemination des Ovarialkarzinom und der Ausbildung einer Peritonealkarzinose beteiligt sein [110, 111, 117]. NT-3 und sein Rezeptor TrkC konnten in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden [118-120]. Zum Ovarialkarzinom liegen bislang jedoch keine Untersuchungen vor. Für TrkC wird angenommen, dass er als „*dependence receptor*“ arbeitet, also in Abhängigkeit vom Vorliegen des Liganden NT-3 unterschiedliche Funktionen hat. TrkC ist proapoptotisch, in Gegenwart von NT-3 hingegen wird die Apoptose unterdrückt und das Wachstum des Tumors begünstigt [121]. In Tumorzellen des Neuroblastom konnte gezeigt werden, dass NT-3 autokrin produziert wird, die TrkC-induzierte Apoptose unterdrückt und die Zellen sich so einen Überlebensvorteil verschaffen [119].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisherige Untersuchungen der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren im Ovarialkarzinom in erster Linie auf die Induktion der Angiogenese und die Steigerung des Tumorwachstums abzielen. Die Expression von NGF, NT-3 und BDNF in der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms lässt sich hierüber gut erklären. Allerdings scheinen die Neurotrophine keinen Einfluss auf das Nervenfasern-

wachstum und somit auch keine Bedeutung in der Schmerzpathogenese zu haben. In der peritonealen Endometriose hingegen ist ein Mitwirken der Neurotrophine an der Entstehung von Schmerz sehr wahrscheinlich.

4.3 Neurotrophe Eigenschaften

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuronaler Wachstums-Assay mit sensiblen Hühnerembryoganglien durchgeführt. Es zeigte sich sowohl in den Peritonealfüssigkeiten von Patientinnen mit peritonealer Endometriose als auch in den Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit einer Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom ein Aussprossen sensibler Neuriten. Das Ausmaß der sensiblen Neuritenausprossung war hierbei für beide Erkrankungen vergleichbar, allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ausgemacht werden. Wie zuvor geschildert konnten die Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF sowohl in den Peritonealfüssigkeiten als auch in den Aszitesflüssigkeiten nachgewiesen werden, es konnte jedoch kein Unterschied der relativen Konzentrationen in den Flüssigkeiten von peritonealer Endometriose, Peritonealkarzinose und Kontrollgruppe zueinander aufgezeigt werden. Dass Neurotrophine ein Aussprossen von Hühnerembryoganglien bewirken konnte bereits gezeigt werden [122]. In Untersuchungen von Patientinnen mit Endometriose konnte bei Inkubation von Hühnerembryoganglien in Peritonealfüssigkeiten ein Nervenwachstum bereits aufgezeigt und mittels NGF-Inhibitor anschließend wieder reduziert werden [69]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass NGF die Innervation der peritonealen Endometriose steigert. In den Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom konnten ebenfalls Neurotrophine nachgewiesen, als auch eine Neuritenausprossung von Hühnerembryoganglien bei Inkubation in der Aszitesflüssigkeit festgestellt werden. Trotzdem finden sich um die Tumorzellnester einer Peritonealkarzinose nur wenige Nervenfasern. Es muss also davon ausgegangen werden, dass für das gesteigerte Einsprossen von Nervenfasern um peritoneale Endometrioseläsionen zusätzlich noch weitere Faktoren Einfluss nehmen.

4.4 Einfluss von Östrogen

Endometriose ist eine Östrogen-abhängige Erkrankung. Östrogen unterhält Endometrioseläsionen [45], wofür auch das vordringliche Auftreten der Erkrankung bei Frauen in der reproduktiven Lebensphase spricht [46]. Niedrige Östrogenspiegel hingegen scheinen sich protektiv auszuwirken. So verhindert die medikamentöse hormonelle Endometriose-therapie den Ablauf eines normalen Ovarialzyklus und reduziert somit auch den Östrogenspiegel [17, 47]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte Östrogen in den Peritonealflüssigkeiten von Patientinnen mit peritonealer Endometriose nachgewiesen werden, wobei sich die einzelnen Werte sehr variabel zeigten. Die durchschnittliche Östrogenkonzentration war dabei nicht definitiv erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Dies deckt sich mit vorangegangenen Studien, die ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Östrogenkonzentration in den Peritonealflüssigkeiten von Patientinnen mit Endometriose und einer Kontrollgruppe finden konnten [123-125]. Die Konzentration von Östrogen in der Peritonealflüssigkeit scheint demnach keinen direkten Einfluss auf das Auftreten von peritonealer Endometriose zu haben. Jedoch bleibt Östrogen ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese der Erkrankung. Östrogen stimuliert die Proliferation des gesunden Endometriums wie auch der Endometrioseläsion [42-45]. Zudem können Endometrioseläsionen eigenständig und unabhängig von der physiologischen Östrogensynthese über die Expression des Enzyms Aromatase Östrogen bilden [48, 49]. Die Synthese der Aromatase erfolgt über PGE₂ und COX-2, welche im Rahmen von Entzündungsreaktionen synthetisiert werden und sich auch in Endometriose als vermehrt exprimiert zeigen [53, 54, 57-59]. Entscheidend für die Wirkung von Östrogen ist auch die Expression der Östrogenrezeptoren ER α und ER β in der Endometrioseläsion. Auch wenn bisherige Studien hier keine eindeutigen Ergebnisse erzielen konnten, so wird doch ein im Vergleich zum gesunden Endometrium abweichendes Verhältnis der Expression von ER α und ER β in der Endometrioseläsion als pathogenetischer Einflussfaktor angesehen [126, 127]. Zudem wird ein Einfluss von Östrogen auf sensible Nervenfasern angenommen, wodurch auch Östrogen selbst Schmerz in Endometriose verursachen könnte [60-62]. Bisher ist hierbei nur unzureichend erforscht, ob Östrogen direkt Schmerzreize an Nervenfasern auslöst, Schmerzrezeptoren sensibilisiert oder Wachstum und Dichte sensibler Nervenfasern beeinflusst. Daher sollten die zugrundeliegenden Mechanismen der Schmerzübertragung durch Östrogen weiterführend untersucht werden.

Die Bestimmung der Konzentration von Östrogen in den Peritonealflüssigkeiten von Patientinnen mit peritonealer Endometriose ergab im Mittel deutlich höhere Werte als in den Aszitesflüssigkeiten von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom. Auch die Kontrollgruppe wies gegenüber den Patientinnen mit Peritonealkarzinose höhere Östrogenkonzentrationen auf. Eine vorliegende Studie untersuchte die Östrogenkonzentration in Aszites von Frauen mit Ovarialkarzinom [128]. Das Patientinnenkollektiv zeigte sich in Bezug auf das Alter vergleichbar, in den meisten Fällen lag intraoperativ ebenfalls eine Peritonealkarzinose vor. Die Konzentration von Östrogen in Aszitesflüssigkeiten war auch hier deutlich niedriger im Vergleich zu den zu diesem Zeitpunkt nicht veröffentlichten Kontrolldaten der Peritonealflüssigkeiten von Patientinnen mit gutartigen gynäkologischen Erkrankungen. Während das Alter der Kontrollpatientinnen dieser Studie nicht angegeben wurde, so sind die Patientinnen der Endometriose- als auch Kontrollgruppe in dieser Arbeit hauptsächlich in der reproduktiven Phase. Die Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom hingegen waren mehrheitlich postmenopausal. Das Ovarialkarzinom kann zwar in jedem Alter auftreten, häuft sich jedoch ab dem 40. Lebensjahr. Über 70% aller erkrankten Frauen sind 50 Jahre oder älter und damit überwiegend in der Postmenopause [129]. Die unterschiedlichen Konzentrationen an Östrogen ließen sich demnach generell auch anhand der Lebensphase der Frauen erklären, wobei die reproduktive Phase per se mit einer gesteigerten ovariellen Östrogensynthese einhergeht. Folglich sollte zunächst sowohl die Östrogenkonzentration in Peritonealflüssigkeit von gesunden postmenopausalen Frauen als auch die Aszitesflüssigkeit von prämenopausalen Frauen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom untersucht werden. Hierüber ließe sich eine mögliche Abhängigkeit von der jeweiligen reproduktiven Phase der Patientinnen vergleichend beurteilen. Zudem wurde die Östrogenkonzentration in dieser Arbeit alleinig in den Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten gemessen, so dass ein unmittelbarer Einfluss auf die Schmerzpathogenese nicht belegt werden kann.

Dennoch ist es anhand der Ergebnisse dieser Arbeit denkbar, dass Östrogen die erhöhte Nervenfaserdichte in peritonealer Endometriose mitbedingt. Die auffallend erhöhte Östrogenkonzentration der Peritonealflüssigkeiten von peritonealer Endometriose im Vergleich zur Aszitesflüssigkeit der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms könnte die unterschiedliche peritoneale Innervation als auch das unterschiedliche Auftreten von Schmerzen in beiden Erkrankungen erklären.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Als größte seröse Membran des Körpers kleidet das Peritoneum die Peritonealhöhle aus. Zwei gynäkologisch relevante Erkrankungen mit Beteiligung des Peritoneums sind die peritoneale Endometriose und die Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms. Diese fallen durch ihre grundlegend verschiedenartige klinische Präsentation auf. Das Leitsymptom der Endometriose des Peritoneums sind Schmerzen, wobei das Ausmaß der Erkrankung nicht mit der Schmerzintensität korreliert und auch kleine Herde starke Schmerzen verursachen können. Die Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms hingegen präsentiert sich zumeist mit unspezifischen Symptomen, trotzdem häufig ausge dehnte peritoneale Befunde vorliegen. Da bislang nur wenig über die dem Schmerz zugrundeliegenden Mechanismen beider peritonealen Erkrankungen bekannt ist, wurden diese im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf die Schmerzpathogenese vergleichend untersucht.

Im Gegensatz zur direkten Umgebung der Endometrioseläsionen wurde eine signifikant niedrigere Gesamtnervenfaserdichte um Tumorzellen ermittelt. Auch die für die Schmerzweiterleitung verantwortlichen sensiblen Nervenfasern lagen im Vergleich zur nahen Umgebung der Endometrioseläsionen in geringerer Anzahl nahe den Tumorzellen vor. Demgemäß ist eine Beteiligung von Nervenfasern an der Entstehung der für Endometriose typischen Schmerzen durchaus denkbar, während die geringe Nervenfaserdichte um die Peritonealkarzinose gut zur unspezifischen klinischen Präsentation des Ovarialkarzinoms passt. Die Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF konnten sowohl im Gewebe der peritonealen Endometriose als auch in der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms nachgewiesen werden. Ebenso fanden sich die genannten Neurotrophine in den Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten. Zudem konnte in einem neuronalen Wachstums-Assay ein Aussprossen sensibler Ganglien inkubiert in den Peritoneal- und Aszitesflüssigkeiten beobachtet werden. Es ist demnach davon auszugehen, dass diese Flüssigkeiten neuromodulatorische Eigenschaften besitzen. Insbesondere für NGF wird angenommen, dass es das Nervenfasernwachstum fördert, wodurch folglich die gesteigerte Innervation in der peritonealen Endometriose bedingt sein könnte. Über proinflammatorische Mediatoren bewirkt NGF aber auch eine Aktivierung und Sensitivierung sensibler Nervenfasern und kann hierüber zur Entstehung von Schmerz beitragen. In der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms hingegen scheint das Vorhandensein von Neurotrophinen nicht zum Einsprossen von Nervenfasern zu führen. Vielmehr wird

den Neurotrophinen und ihren Rezeptoren entsprechend bisheriger Untersuchungen ein wesentlicher Beitrag in der Induktion der Angiogenese und damit der Steigerung des Tumorwachstums zugesprochen. Trotzdem in der peritonealen Endometriose ein Mitwirken der Neurotrophine an der Entstehung von Schmerz wahrscheinlich ist, muss davon ausgegangen werden, dass weitere pathogenetische Faktoren beteiligt sind.

Östrogen wäre ein solcher Faktor. Es wird angenommen, dass Östrogen über bislang nicht ausreichend geklärt Mechanismen Einfluss auf sensible Nervenfasern nimmt. Demnach könnte Östrogen beteiligt sein an der Schmerzentstehung in Endometriose. Die Östrogenkonzentration in den Peritoneal- bzw. Aszitesflüssigkeiten zeigte sich in Endometriose deutlich höher als im Ovarialkarzinom. Das erhöhte Vorkommen von Östrogen in Endometriose könnte die gesteigerte peritoneale Innervation begründen. Zudem könnte dies den Unterschied zwischen der typischerweise schmerzhaft verlaufenden peritonealen Endometriose und der im Vergleich dazu unspezifischen Symptomatik der Peritonealkarzinose des Ovarialkarzinoms erklären. Da die Patientinnen mit peritonealer Endometriose in dieser Arbeit in der reproduktiven Phase sind, während sich die Patientinnen mit Ovarialkarzinom mehrheitlich in der Postmenopause befinden, sind weitere Untersuchungen vonnöten, um eine Abhängigkeit von der reproduktiven Lebensphase der Frauen zu prüfen.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit ist ein Beteiligtsein von Nervenfasern, Neurotrophinen und Östrogen an der Schmerzpathogenese der peritonealen Endometriose denkbar. Diese Aspekte sollten folglich weiterführend untersucht werden. Ein gutes Verständnis des Schmerzes als Leitsymptom der Endometriose ist essentiell um erfolgreiche Therapiemethoden zu etablieren.

Literaturverzeichnis

1. Standring, S., *Gray's Anatomy - The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 2008, London: Elsevier.
2. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2003, Stuttgart: Thieme Verlag.
3. Slater, N.J., A.T. Raftery, and G.H. Cope, *The ultrastructure of human abdominal mesothelium*. *J Anat*, 1989. **167**: p. 47-56.
4. Nichols, J.E. and M.P. Steinkampf, *Detection of free peritoneal fluid by transvaginal sonography*. *J Clin Ultrasound*, 1993. **21**(3): p. 171-4.
5. Brown, S.E. and P.A. Dubbins, *Detection of free intraperitoneal fluid in healthy young men*. *J Ultrasound Med*, 2012. **31**(10): p. 1527-30.
6. Meyers, M.A., *The spread and localization of acute intraperitoneal effusions*. *Radiology*, 1970. **95**(3): p. 547-54.
7. van Furth, R., J.A. Raeburn, and T.L. van Zwet, *Characteristics of human mononuclear phagocytes*. *Blood*, 1979. **54**(2): p. 485-500.
8. Wassilev, W., et al., *A scanning electron microscopy study of peritoneal stomata in different peritoneal regions*. *Ann Anat*, 1998. **180**(2): p. 137-43.
9. Suassuna, J.H., et al., *Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on CAPD*. *Kidney Int*, 1994. **46**(2): p. 443-54.
10. Vigano, P., et al., *Endometriosis: epidemiology and aetiological factors*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004. **18**(2): p. 177-200.
11. Sampson, J.A., *Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity*. *Am J Obstet Gynecol*, 1927. **14**: p. 422-469.
12. Sinaii, N., et al., *Differences in characteristics among 1,000 women with endometriosis based on extent of disease*. *Fertil Steril*, 2008. **89**(3): p. 538-45.
13. Tuttlies, F., et al., *[ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]*. *Zentralbl Gynakol*, 2005. **127**(5): p. 275-81.
14. *Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996*. *Fertil Steril*, 1997. **67**(5): p. 817-21.
15. Vercellini, P., et al., *The effect of surgery for symptomatic endometriosis: the other side of the story*. *Hum Reprod Update*, 2009. **15**(2): p. 177-88.
16. Vercellini, P., et al., *'Waiting for Godot': a commonsense approach to the medical treatment of endometriosis*. *Hum Reprod*, 2011. **26**(1): p. 3-13.
17. Crosignani, P., et al., *Advances in the management of endometriosis: an update for clinicians*. *Hum Reprod Update*, 2006. **12**(2): p. 179-89.

18. Allen, C., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(2): p. CD004753.
19. Simoens, S., L. Hummelshoj, and T. D'Hooghe, *Endometriosis: cost estimates and methodological perspective*. Hum Reprod Update, 2007. **13**(4): p. 395-404.
20. Jenkins, S., D.L. Olive, and A.F. Haney, *Endometriosis: pathogenetic implications of the anatomic distribution*. Obstet Gynecol, 1986. **67**(3): p. 335-8.
21. Kaiser, A., et al., *The influence of peritoneal endometriotic lesions on the generation of endometriosis-related pain and pain reduction after surgical excision*. Arch Gynecol Obstet, 2009. **280**(3): p. 369-73.
22. Gruppo Italiano per lo Studio, d.E., *Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain*. Hum Reprod, 2001. **16**(12): p. 2668-71.
23. Vercellini, P., et al., *Association between endometriosis stage, lesion type, patient characteristics and severity of pelvic pain symptoms: a multivariate analysis of over 1000 patients*. Hum Reprod, 2007. **22**(1): p. 266-71.
24. Haney, A.F., J.J. Muscato, and J.B. Weinberg, *Peritoneal fluid cell populations in infertility patients*. Fertil Steril, 1981. **35**(6): p. 696-8.
25. Olive, D.L., J.B. Weinberg, and A.F. Haney, *Peritoneal macrophages and infertility: the association between cell number and pelvic pathology*. Fertil Steril, 1985. **44**(6): p. 772-7.
26. Dunselman, G.A., et al., *Functional aspects of peritoneal macrophages in endometriosis of women*. J Reprod Fertil, 1988. **82**(2): p. 707-10.
27. Khan, K.N., et al., *Differential macrophage infiltration in early and advanced endometriosis and adjacent peritoneum*. Fertil Steril, 2004. **81**(3): p. 652-61.
28. Tran, L.V., et al., *Macrophages and nerve fibres in peritoneal endometriosis*. Hum Reprod, 2009. **24**(4): p. 835-41.
29. Eisermann, J., et al., *Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery*. Fertil Steril, 1988. **50**(4): p. 573-9.
30. Tseng, J.F., et al., *Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(3): p. 1118-22.
31. Punnonen, J., et al., *Increased levels of interleukin-6 and interleukin-10 in the peritoneal fluid of patients with endometriosis*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(5): p. 1522-6.
32. Arici, A., et al., *Interleukin-8 concentration in peritoneal fluid of patients with endometriosis and modulation of interleukin-8 expression in human mesothelial cells*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(1): p. 40-5.
33. Gazvani, M.R., et al., *Peritoneal fluid concentrations of interleukin-8 in women with endometriosis: relationship to stage of disease*. Hum Reprod, 1998. **13**(7): p. 1957-61.
34. Wang, X.Q., et al., *The high level of RANTES in the ectopic milieu recruits macrophages and induces their tolerance in progression of endometriosis*. J Mol Endocrinol, 2010. **45**(5): p. 291-9.

35. Bolin, L.M., et al., *Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES*. J Neuroimmunol, 1998. **81**(1-2): p. 49-57.
36. George, A., et al., *Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury*. Exp Neurol, 1999. **160**(1): p. 124-32.
37. Murphy, P.G., et al., *Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(7): p. 2243-53.
38. Woolf, C.J., et al., *Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity*. Neuroscience, 1994. **62**(2): p. 327-31.
39. Safieh-Garabedian, B., et al., *Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia*. Br J Pharmacol, 1995. **115**(7): p. 1265-75.
40. Aloe, L. and R. Levi-Montalcini, *Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor*. Brain Res, 1977. **133**(2): p. 358-66.
41. Susaki, Y., et al., *Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor*. Blood, 1996. **88**(12): p. 4630-7.
42. Alsbach, G.P., et al., *Subcellular distribution of estradiol and estrone in human endometrium and myometrium during the menstrual cycle*. Contraception, 1983. **27**(4): p. 409-21.
43. Snijders, M.P., et al., *Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause*. J Reprod Fertil, 1992. **94**(2): p. 363-71.
44. Mylonas, I., et al., *Steroid receptors ERalpha, ERbeta, PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium*. Histol Histopathol, 2007. **22**(2): p. 169-76.
45. Dizerega, G.S., D.L. Barber, and G.D. Hodgen, *Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression*. Fertil Steril, 1980. **33**(6): p. 649-53.
46. Haas, D., et al., *Endometriosis: a premenopausal disease? Age pattern in 42,079 patients with endometriosis*. Arch Gynecol Obstet, 2012. **286**(3): p. 667-70.
47. Sangi-Haghpeykar, H. and A.N. Poindexter, 3rd, *Epidemiology of endometriosis among parous women*. Obstet Gynecol, 1995. **85**(6): p. 983-92.
48. Noble, L.S., et al., *Aromatase expression in endometriosis*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(1): p. 174-9.
49. Kitawaki, J., et al., *Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium*. Biol Reprod, 1997. **57**(3): p. 514-9.
50. Noble, L.S., et al., *Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 600-6.

51. Shimizu, Y., et al., *Dienogest, a synthetic progestin, inhibits prostaglandin E2 production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a spheroid culture system*. Steroids, 2011. **76**(1-2): p. 60-7.
52. Yamanaka, K., et al., *Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture*. Fertil Steril, 2012. **97**(2): p. 477-82.
53. Ota, H., et al., *Distribution of cyclooxygenase-2 in eutopic and ectopic endometrium in endometriosis and adenomyosis*. Hum Reprod, 2001. **16**(3): p. 561-6.
54. Rakhila, H., et al., *Identification of multiple and distinct defects in prostaglandin biosynthetic pathways in eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis*. Fertil Steril, 2013. **100**(6): p. 1650-9 e1-2.
55. Akarasereenont, P., et al., *The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C*. Inflamm Res, 2000. **49**(9): p. 460-5.
56. Tamura, M., et al., *Estrogen up-regulates cyclooxygenase-2 via estrogen receptor in human uterine microvascular endothelial cells*. Fertil Steril, 2004. **81**(5): p. 1351-6.
57. Arias-Negrete, S., K. Keller, and K. Chadee, *Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(2): p. 582-9.
58. Huang, Z.F., J.B. Massey, and D.P. Via, *Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(2): p. 187-94.
59. Carli, C., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic cells by macrophage migration inhibitory factor: involvement of novel kinase signaling pathways*. Endocrinology, 2009. **150**(7): p. 3128-37.
60. Blacklock, A.D., et al., *Estrogen increases sensory nociceptor neuritogenesis in vitro by a direct, nerve growth factor-independent mechanism*. Eur J Neurosci, 2005. **21**(9): p. 2320-8.
61. Chakrabarty, A., et al., *Estrogen elicits dorsal root ganglion axon sprouting via a renin-angiotensin system*. Endocrinology, 2008. **149**(7): p. 3452-60.
62. Cho, T. and V.V. Chaban, *Expression of P2X3 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons from estrogen receptors-alpha and estrogen receptor-beta knockout mice*. Neuroreport, 2012. **23**(9): p. 530-4.
63. Tokushige, N., et al., *Nerve fibres in peritoneal endometriosis*. Hum Reprod, 2006. **21**(11): p. 3001-7.
64. Mechsner, S., et al., *A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions*. Fertil Steril, 2009. **92**(6): p. 1856-61.

65. Mechsner, S., et al., *Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions*. Fertil Steril, 2007. **88**(3): p. 581-7.
66. Arnold, J., et al., *Neuroimmunomodulatory alterations in non-lesional peritoneum close to peritoneal endometriosis*. Neuroimmunomodulation, 2013. **20**(1): p. 9-18.
67. Berkley, K.J., et al., *Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 11094-8.
68. Straub, R.H., *Autoimmune disease and innervation*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(5): p. 528-34.
69. Arnold, J., et al., *Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis*. Brain Behav Immun, 2012. **26**(1): p. 132-41.
70. Tokushige, N., et al., *Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis*. Fertil Steril, 2008. **90**(5): p. 1589-98.
71. Tokushige, N., et al., *Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis*. Fertil Steril, 2009. **92**(4): p. 1234-9.
72. Wang, G., N. Tokushige, and I.S. Fraser, *Nerve fibers and menstrual cycle in peritoneal endometriosis*. Fertil Steril, 2011. **95**(8): p. 2772-4.
73. Bibel, M. and Y.A. Barde, *Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2919-37.
74. Jankowski, M.P. and H.R. Koerber, *Neurotrophic Factors and Nociceptor Sensitization, in Translational Pain Research: From Mouse to Man*, L. Kruger and A.R. Light, Editors. 2010: Boca Raton, FL.
75. Pezet, S. and S.B. McMahon, *Neurotrophins: mediators and modulators of pain*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 507-38.
76. Pearce, F.L. and H.L. Thompson, *Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor*. J Physiol, 1986. **372**: p. 379-93.
77. Malcangio, M., et al., *Nerve growth factor- and neurotrophin-3-induced changes in nociceptive threshold and the release of substance P from the rat isolated spinal cord*. J Neurosci, 1997. **17**(21): p. 8459-67.
78. Zhou, X.F., et al., *Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(1): p. 100-5.
79. Bennett, D.L., *Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive function*. Neuroscientist, 2001. **7**(1): p. 13-7.
80. Apfel, S.C., et al., *Nerve growth factor regulates the expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the peripheral nervous system*. Mol Cell Neurosci, 1996. **7**(2): p. 134-42.
81. Cho, H.J., et al., *Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation*. Brain Res, 1997. **749**(2): p. 358-62.

82. Cho, H.J., et al., *Increased brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation*. Brain Res, 1997. **764**(1-2): p. 269-72.
83. Helgren, M.E., et al., *Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy*. J Neurosci, 1997. **17**(1): p. 372-82.
84. Borghese, B., et al., *[Neurotrophins and pain in endometriosis]*. Gynecol Obstet Fertil, 2010. **38**(7-8): p. 442-6.
85. Barcena de Arellano, M.L., et al., *Influence of nerve growth factor in endometriosis-associated symptoms*. Reprod Sci, 2011. **18**(12): p. 1202-10.
86. Barcena de Arellano, M.L., et al., *Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions*. Fertil Steril, 2011. **95**(3): p. 1123-6.
87. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 9-29.
88. Prat, J. and F.C.o.G. Oncology, *Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum*. Int J Gynaecol Obstet, 2014. **124**(1): p. 1-5.
89. Kaku, T., et al., *Histological classification of ovarian cancer*. Med Electron Microsc, 2003. **36**(1): p. 9-17.
90. Menczer, J., et al., *The effect of symptom duration in epithelial ovarian cancer on prognostic factors*. Arch Gynecol Obstet, 2009. **279**(6): p. 797-801.
91. Howlader N, N.A., Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds), *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011*, National Cancer Institute. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, Bethesda, MD, April 2014.
92. Heintz, A.P., et al., *Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer*. Int J Gynaecol Obstet, 2006. **95 Suppl 1**: p. S161-92.
93. Matsuo, K., et al., *Patient-reported symptoms and survival in ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2011. **21**(9): p. 1555-65.
94. Goff, B.A., et al., *Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics*. JAMA, 2004. **291**(22): p. 2705-12.
95. Goff, B.A., et al., *Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection*. Cancer, 2007. **109**(2): p. 221-7.
96. Partridge, E., et al., *Results from four rounds of ovarian cancer screening in a randomized trial*. Obstet Gynecol, 2009. **113**(4): p. 775-82.
97. Menon, U., et al., *Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS)*. Lancet Oncol, 2009. **10**(4): p. 327-40.

98. Buys, S.S., et al., *Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2295-303.
99. Piso, P. and D. Arnold, *Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(47): p. 802-8.
100. Amate, P., et al., *Ovarian cancer: sites of recurrence*. Int J Gynecol Cancer, 2013. **23**(9): p. 1590-6.
101. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **324**(1): p. 1-8.
102. Lu, Z., et al., *Presence of two signaling TGF-beta receptors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage*. Dig Dis Sci, 1997. **42**(10): p. 2054-63.
103. Dolle, L., et al., *Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5592-601.
104. Adriaenssens, E., et al., *Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(2): p. 346-51.
105. Dai, Y., et al., *Anatomical distribution of pelvic deep infiltrating endometriosis and its relationship with pain symptoms*. Chin Med J (Engl), 2012. **125**(2): p. 209-13.
106. Wang, G., et al., *Rich innervation of deep infiltrating endometriosis*. Hum Reprod, 2009. **24**(4): p. 827-34.
107. Kajitani, T., et al., *Possible involvement of nerve growth factor in dysmenorrhea and dyspareunia associated with endometriosis*. Endocr J, 2013. **60**(10): p. 1155-64.
108. Svensson, P., et al., *Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia*. Pain, 2003. **104**(1-2): p. 241-7.
109. Campos, X., et al., *Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(1): p. 168-75.
110. Yu, X., et al., *Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 543-52.
111. Au, C.W., et al., *Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome*. Cancer Lett, 2009. **281**(2): p. 151-61.
112. Davidson, B., et al., *Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2248-59.
113. Nakamura, K., et al., *Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells*. Cancer Res, 2006. **66**(8): p. 4249-55.
114. Lin, C.Y., et al., *Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells*. Biochem Pharmacol, 2014. **91**(4): p. 522-33.

115. Com, E., et al., *Nerve growth factor receptor TrkA signaling in breast cancer cells involves Ku70 to prevent apoptosis*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(11): p. 1842-54.
116. Lagadec, C., et al., *TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells*. Oncogene, 2009. **28**(18): p. 1960-70.
117. Douma, S., et al., *Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB*. Nature, 2004. **430**(7003): p. 1034-9.
118. Xu, X., et al., *Expression of neurotrophin receptor Trk-C in nevi and melanomas*. J Cutan Pathol, 2003. **30**(5): p. 318-22.
119. Bouzas-Rodriguez, J., et al., *Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis*. J Clin Invest, 2010. **120**(3): p. 850-8.
120. Ivanov, S.V., et al., *TrkC signaling is activated in adenoid cystic carcinoma and requires NT-3 to stimulate invasive behavior*. Oncogene, 2013. **32**(32): p. 3698-710.
121. Tauszig-Delamasure, S., et al., *The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(33): p. 13361-6.
122. Bilsland, J., et al., *A rapid method for semi-quantitative analysis of neurite outgrowth from chick DRG explants using image analysis*. J Neurosci Methods, 1999. **92**(1-2): p. 75-85.
123. De Leon, F.D., et al., *Peritoneal fluid volume, estrogen, progesterone, prostaglandin, and epidermal growth factor concentrations in patients with and without endometriosis*. Obstet Gynecol, 1986. **68**(2): p. 189-94.
124. Mahmood, T.A. and A. Templeton, *Peritoneal fluid volume and sex steroids in the pre-ovulatory period in mild endometriosis*. Br J Obstet Gynaecol, 1991. **98**(2): p. 179-83.
125. Khan, K.N., et al., *Effect of human seminal fluid on the growth of endometrial cells of women with endometriosis*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010. **149**(2): p. 204-9.
126. Huhtinen, K., et al., *Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **358**(2): p. 146-54.
127. Burns, K.A. and K.S. Korach, *Estrogen receptors and human disease: an update*. Arch Toxicol, 2012. **86**(10): p. 1491-504.
128. Chen, F.C., et al., *Prognostic value of serum and ascites levels of estradiol, FSH, LH and prolactin in ovarian cancer*. Anticancer Res, 2009. **29**(5): p. 1575-8.
129. Ries LAG, Y.J., Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner M-J (editors), *SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics*. National Cancer Institute, SEER Program, Bethesda, MD, 2007. NIH Pub. No. 07-6215.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Clara Börner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung peritonealer Schmerzmechanismen: Peritoneale Endometriose und Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom im Vergleich“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum, Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikation 3:

Börner C, Scherer C, Buschow R, Chiantera V, Sehouli J, Mechsner S; „*Pain mechanisms in peritoneal diseases might be partially regulated by estrogen*“; Veröffentlichung angenommen in Reproductive Science.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der experimentellen Arbeiten
 Auswertung der Daten
 Schriftliche Umsetzung

Datum, Unterschrift und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Datum, Unterschrift der Doktorandin

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst und zuvörderst Frau Prof. Dr. med. Sylvia Mechsner, die als meine Doktormutter alle Voraussetzungen für das Gelingen dieser Arbeit schaffte und mir kontinuierlich mit kompetentem Rat zur Seite stand. Durch ihre eigene Begeisterung und ihren Einsatz für die Endometrioseforschung hat sie in mir das Interesse und die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt.

Mein Dank gilt weiterhin dem Team des Endometrioseforschungslabors für die tatkräftige Hilfe und die anregenden Diskussion, welche wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt ferner meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, Stefan und Christiane Börner, sowie meiner Schwester Gerda Börner. Ihre bedingungslose Unterstützung auf meinem Lebensweg und ihr fortwährender Zuspruch haben mir sowohl das Studium als auch diese Promotion ermöglicht.

Mein Dank gilt überdies meinen Freunden, besonders Cordula Groß und Alexander Wolf, die mich mit Verständnis und motivierenden Worten begleitet haben.