

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin mit
Hochschulambulanz
Direktor: Professor Dr. med. Achim Schneider M.P.H.

Neurotrophe Eigenschaften der Endometriose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Jessica Schwarz
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. h. c. A. D. Ebert

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Bollmann

Koreferent: JProf. Dr. A. Bräuer

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 27.03.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die Endometriose	7
1.1.1	Definition	7
1.1.2	Epidemiologie	7
1.1.3	Einteilung	7
1.1.4	Pathogenese	8
1.1.5	Symptomatik	9
1.1.6	Diagnostik	10
1.1.7	Therapiemöglichkeiten	11
1.2	Endometriose und Nerven	12
2	Ziel der Untersuchungen	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Patientinnen	15
3.2	Probengewinnung	16
3.3	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten	17
3.3.1	Herstellung von Gewebeschnitten	17
3.3.2	Entparaffinierung	17
3.3.3	Antigen-Demaskierungsverfahren am Gewebeschnitt	18
3.3.4	Immunhistochemische Färbungen	18
3.3.5	Immunfluoreszenz-Färbungen	21
3.4	Endometriose-Zellkultur	23
3.4.1	Zelllinien	23
3.4.2	Gewinnung und Kultivierung von primären Endometriosekulturen	23
3.4.3	Passagierung	24
3.4.4	Gewinnung von Konditionierten Versuchsmedien	24
3.5	Immunfluoreszenz an fixierten Endometriosezellen	24
3.5.1	Kultivierung, Fixierung und Permeabilisierung der Endometriosezellen	24
3.5.2	Nerve-Growth-Factor- und Vimentin- oder Cytokeratin-Doppelfärbung	25
3.6	Proteinbiochemische Untersuchungen	25
3.6.1	Proteinpräparation	25
3.6.2	Proteinbestimmung	26
3.6.3	Reduktion	27
3.6.4	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27

3.6.5	Western Blot.....	27
3.7	Neuronal Growth Assay	28
3.7.1	Lagerung und Bebrüten der Eier	28
3.7.2	Präparation der Hinterwurzelganglien	28
3.7.3	Versuchsaufbau	28
3.7.4	Auswertung	29
3.7.5	Immunfluoreszenz an fixierten Ganglien.....	29
3.8	Materialien	30
3.8.1	Geräte	30
3.8.2	Gebrauchsfertige Materialien.....	32
3.8.3	Medien.....	36
3.8.4	Lösungen	36
3.8.5	Puffer.....	37
3.9	Statistik.....	38
4	Resultate	39
4.1	Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen.....	39
4.1.1	Neurofilamentfärbung	39
4.1.2	Neurofilament- und Substanz-P-Doppelfärbung.....	41
4.2	Vaskularisation von Endometrioseherden – Neurofilament-, von-Willebrand-Faktor- und Smooth-Muscle-Actin-Dreifachfärbung.....	41
4.3	Nervenwachstumsmarker in Nervenfasern von peritonealen Endometrioseläsionen – Growth-Associated-Protein-43-Färbung.....	44
4.4	Nervenwachstumsfaktoren in peritonealen Endometrioseläsionen.....	44
4.4.1	Nerve-Growth-Factor-Färbung	45
4.4.2	Neurotrophin-3-Färbung	46
4.4.3	Nerve-Growth-Factor- und Vimentin- oder Cytokeratin-Doppelfärbung.....	47
4.4.4	Nerve Growth Factor Western Blot	48
4.5	Wechselwirkungen zwischen Endometriose- und Nervenzellen	49
4.5.1	Neuronal Growth Assay	49
4.5.2	Neurofilamentfärbung der Hinterwurzelganglien	51
5	Diskussion.....	52
5.1	Nachweis von sensiblen Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen	52
5.2	Nachweis einer unreifen Vaskularisation von Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen	53

5.3	Nachweis von Nervenwachstumsmarkern in Nervenfasern von peritonealen Endometrioseläsionen	54
5.4	Nachweis von Nervenwachstumsfaktoren in peritonealen Endometrioseläsionen, Douglasflüssigkeit von Endometriosepatientinnen und in von Endometriosezellen Konditioniertem Medium.....	54
5.5	Nachweis von neurotrophen Eigenschaften von Endometrioseläsionen.....	55
6	Schlussfolgerung	57
7	Zusammenfassung.....	58
8	Literaturverzeichnis.....	60

1 Einleitung

1.1 Die Endometriose

1.1.1 Definition

Unter dem Begriff Endometriose wird das Auftreten von Gewebe außerhalb des Cavum uteri, das biologisch der basalen Gebärmutter Schleimhaut ähnlich ist, definiert. Das Krankheitsbild geht mit den Hauptsymptomen schwerer Dysmenorrhoe, chronischen zyklischen und azyklischen Unterbauchschmerzen, Dyspareunie, Dysurie und Dyschezie einher.

1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der Endometriose bei Frauen ohne Endometriose-assoziierte Beschwerden im reproduktionsfähigen Alter wird zwischen 6 % und 45 % angegeben und steigt bei Patientinnen mit Endometriose-assoziierten Beschwerden auf bis zu 50 % (Balasch et al. 1996, Mahmood et al. 1991, Rawson 1991, Waller et al. 1993).

1.1.3 Einteilung

Nach der Lokalisation unterscheidet man zwischen der Endometriosis genitalis interna (Adenomyosis uteri), Endometrium im Myometrium von Uterus und Tuben, und der Endometriosis genitalis externa. Hier hat sich endometriumartiges Gewebe an anderer Stelle im kleinen Becken, zum Beispiel an den Ovarien oder am Peritoneum angesiedelt. Um eine Endometriosis extragenitalis handelt es sich bei der Absiedlung von endometrialem Gewebe außerhalb des kleinen Beckens. Zu der Endometriosis extragenitalis zählen Endometriosemanifestationen der Blase, des Darmes, der Ureteren, des Zwerchfells, der Haut und des Bauchnabels. Davon wird die rektovaginale Endometriose, Endometrioseherde im Spatium rektovaginale, unterschieden.

Die Einteilung der Endometriosis genitalis externa wird mit der revidierten Fassung der Amerikanischen Fertilitätsgesellschaft rASRM (1997), die ein subtiles Punktesystem benutzt, vorgenommen. Es werden die Anzahl, die Ausdehnung in cm², die Lokalisation und die Infiltrationstiefe der endometrioiden Läsionen dokumentiert. Aber auch die Ausdehnung und Qualität der Adhäsionen im kleinen Becken werden berücksichtigt. Endometrioseherde außerhalb des kleinen Beckens, retroperitoneale Manifestationen, die Aktivitätsmerkmale der Läsionen und die klinische Symptomatik fließen jedoch nicht mit ein. So kann mit dieser Klassifikation beschrieben werden, wie ausgedehnt der makroskopische Befund im kleinen

Becken ist, eine Korrelation zur klinischen Schmerzsymptomatik ist jedoch nicht möglich (Fedele et al. 1990, Vercellini et al. 1996). Dies stellt ein Problem in der klinischen Anwendung dar. Mit dem ENZIAN-Score wurde eine neue Klassifikation der tief infiltrierenden Endometriose, also palpablen Endometrioseknoten (Fauconnier et al. 2002) vorgestellt. Es wird insbesondere auf die retroperitoneale Manifestation der schweren Endometrioseerkrankung Bezug genommen. Dabei werden vier Stadien in Anlehnung an ein onkologisches Staging unterschieden. Weitere Untergruppen ergeben sich aus der Lokalisation und der Ausdehnung der Endometrioseumore (Tuttlies et al. 2005).

Die makroskopisch sichtbaren Veränderungen im Rahmen der Endometriose, am besten anhand der peritonealen Herde der Endometriosis genitalis externa untersucht, sind sehr unterschiedlich und reichen von blauschwarzen Herden über rote Flecken, gelbbraun verfärbtes Peritoneum, bis hin zu fibrotisch weißen Läsionen (Vernon et al. 1986) (**Abbildung 1**). Während weiße Herde, die ein inaktives Stadium der Endometriose darstellen, eine nur geringe mitotische Aktivität aufweisen und nur schwach mit Gefäßen versorgt sind, besitzen rote Läsionen eine größere mitotische Aktivität und sind stärker vaskularisiert (Nisolle et al. 1993).

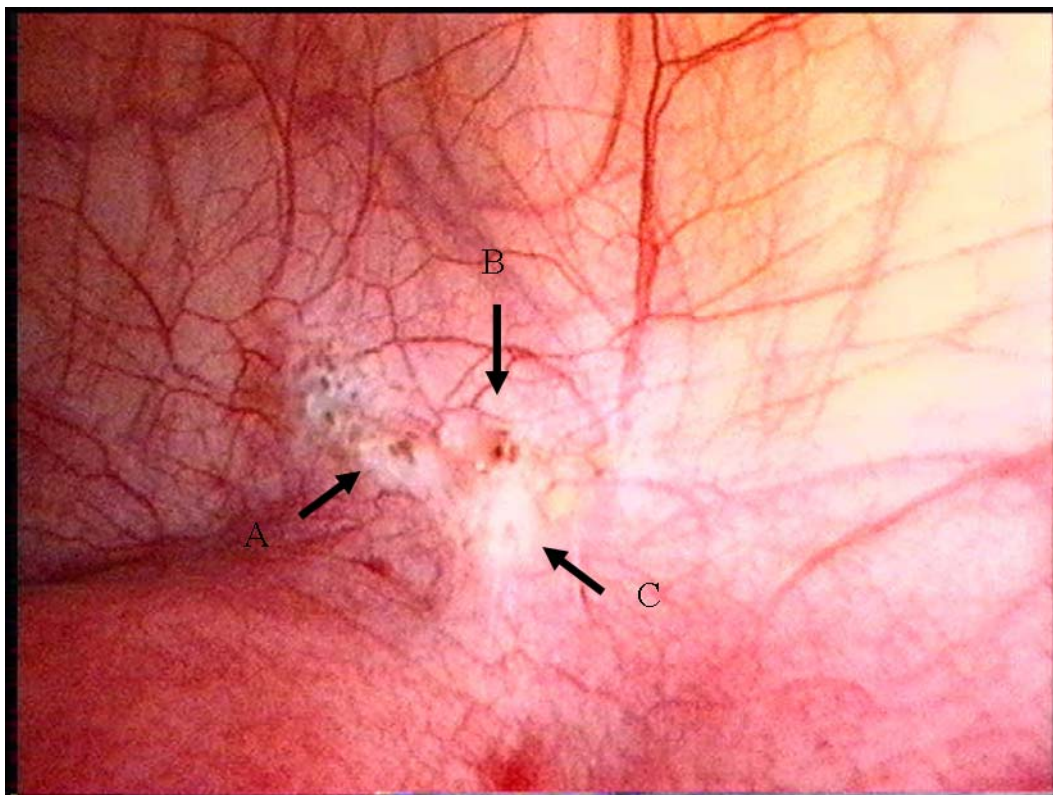


Abbildung 1. Peritonealendometriose mit schwarzen (A), roten (B) und weißen (C) Läsionen

1.1.4 Pathogenese

Schon seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts existieren zwei konkurrierende Ansätze zur Erklärung der Endometrioseentstehung. So beschrieb Meyer die Entstehung der Endometriose

als metaplastische Umwandlung von ortsständigem Gewebe (Meyer 1919). Tatsächlich können in vitro endometriale Läsionen in Gegenwart von Östrogenen, im Sinne einer Metaplasie, aus ovariellen Oberflächenzellen entstehen (Ohtake et al. 1999). Die am meisten verbreitete Theorie zur Entstehung der Endometriose ist jedoch die Verschleppungstheorie nach Sampson. Diese besagt, dass mit dem Menstruationsblut Endometriumzellen retrograd durch die Eileiter in die Bauchhöhle gelangen und sich dort ansiedeln (Sampson 1927). Allerdings erreichen auf diese Weise bei 90% der Frauen endometriale Zellen die Peritonealhöhle (Halme et al. 1984). Dass sich diese Zellen in der Bauchhöhle ansiedeln können, wird versucht, durch weitere Theorien zu erklären. So müssen in der Peritonealhöhle von Endometriosepatientinnen entweder besondere Bedingungen herrschen oder die Endometriumzellen der an Endometriose erkrankten Frauen müssen veränderte Eigenschaften aufweisen.

Immunologische Theorien besagen, dass die körpereigene Abwehr bei Endometriosepatientinnen die Endometriumzellen in der Peritonealhöhle nicht erkennen, nicht abbauen und in ihrer Aktivität nicht hemmen kann (Koninckx et al. 1998, Wu et al. 2007, Wu et al. 2003). Kultiviert man endometriale Stromazellen mit Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen, so ist die Zellteilungsrate signifikant höher als in Kulturansätzen, bei denen Peritonealflüssigkeit von Frauen, die nicht unter Endometriose leiden, zugegeben wurde. Somit scheinen in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen Faktoren vorhanden zu sein, die ein Zellwachstum fördern (Bahtiyar et al. 1998).

Das Archimetra-Konzept von Leyendecker stützt sich auf die Erkenntnis, dass man bei Frauen mit Endometriose eine Hyper- und Dysperistaltik des Uterus feststellen kann. Man nimmt an, dass durch die Arrhythmie in der Peristaltik, im Sinne einer Autotraumatisierung, Fragmente der Basalschicht des Endometriums mittels retrograder Menstruation in den Bauchraum gelangen können. Die Zellen der Basalis besitzen möglicherweise Stammzellcharakter. Auch so könnte das Vorkommen von Endometrioseläsionen mit Komponenten des primordialen Uterus, endometriales Epithel und Stroma und glatte Muskelzellen (Mechsner et al. 2005), erklärt werden (Leyendecker et al. 1998).

1.1.5 Symptomatik

Zu den typischen Leitsymptomen der Erkrankung zählen schwere Dysmenorrhoe, chronische zyklische und azyklische Unterbauchschmerzen, Dyspareunie, Dysurie und Dyschezie (Kennedy et al. 2005). Die Endometrioseerkrankung ist zudem in 30-40 % der Fälle mit Infertilität verbunden (Kistner 1979).

Frauen mit Endometriose leiden häufiger (Forman et al. 1993, Mahmood et al. 1991) und stärker

(Fedele et al. 1992, Muzii et al. 1997) unter Dysmenorrhoe als Frauen ohne Endometriose. Dabei scheint die Schwere der Dysmenorrhoe unabhängig vom makroskopischen Erscheinungsbild der Endometrioseläsionen zu sein (2001, Chapron et al. 2005, Vercellini et al. 1996). Lediglich das Ausmaß von Adhäsionen im Douglasraum ist mit dem Schweregrad der Dysmenorrhoe assoziiert (Fauconnier et al. 2002, Muzii et al. 1997, Porpora et al. 1999). Als Ursache für die Dysmenorrhoe werden eine verstärkte Prostaglandinproduktion im Endometrium, veränderte Uteruskontraktionen im Sinne einer Hyper- und Dysperistaltik und Veränderungen der lokalen Blutversorgung während der Menstruation diskutiert (Tonini 2002). Dabei scheint die Dysmenorrhoe eher einen ursächlichen Zusammenhang mit der Endometriose zu haben, als durch die Endometriose ausgelöst zu sein (Fauconnier et al. 2005, Leyendecker et al. 1998).

Endometriose-assoziierte Symptome korrelieren in ihrer Intensität nicht mit dem rASRM Stadium der Erkrankung (Vercellini et al. 1996) und auch nicht mit dem morphologischen Aspekt der Läsionen (2001, Muzii et al. 1997). Jedoch werden bestimmte Endometriosesymptome mit Lokalisationen von tief infiltrierender Endometriose assoziiert (Chapron et al. 2003, Fauconnier et al. 2002). So ist die Dyspareunie mit tief infiltrierenden Endometrioseherden der Sacrouterinligamente und rektovaginalen Endometrioseherden assoziiert, Dyschezie mit tief infiltrierenden Herden der hinteren Vaginalwand und rektovaginalen Endometrioseherden und Dysurie mit tief infiltrierenden Endometrioseherden der Blase und der Ureteren. Die azyklischen Unterbauchschmerzen scheinen mit tief infiltrierenden Herden des Darmes assoziiert zu sein. (Chapron et al. 2005, Fauconnier et al. 2005, Fauconnier et al. 2002, Porpora et al. 1999, Vercellini et al. 1996) Als Ursachen für die Endometriose-assoziierten Symptome werden lokale Inflammation, Ausbildung von Adhäsionen, Fibrosierung und Mikroblutungen der Endometrioseläsionen diskutiert (Barlow et al. 1993, Cornillie et al. 1990).

Aber nicht jede Frau mit einer Endometriose wird überhaupt symptomatisch (Kennedy et al. 2005, Thomas 1996). Und so bleibt die Frage nach der genauen Pathogenese dieser Schmerzen bisher ungeklärt.

1.1.6 Diagnostik

Die endgültige Abklärung einer bestehenden Symptomatik, also die korrekte Diagnose einer Endometriose sowie ihrer Aktivität, kann derzeit nur invasiv mit einer Bauchspiegelung durch die Inspektion des Situs und histologische Sicherung gestellt werden. Dabei ist der mikroskopische Nachweis von zwei der folgenden drei histomorphologischen Kriterien wünschenswert: glanduläre Strukturen (Epithel), endometroides Stroma und pigmentbeladene

Makrophagen (Kennedy et al. 2005).

Es ist bisher nicht möglich, eine Endometriose anhand biochemischer Parameter oder nicht invasiver bildgebender Verfahren eindeutig zu diagnostizieren. Wegweisend können jedoch die Anamnese, die rektovaginale gynäkologische Untersuchung (Koninckx et al. 1996) und eine vaginale Ultraschalluntersuchung (Moore et al. 2002) mit Transrektalsonographie (Schroder et al. 1997) sein.

1.1.7 Therapiemöglichkeiten

Die Therapie der Endometriose stützt sich auf drei Säulen: die operative Sanierung, die hormonelle Therapie und die symptomatische Schmerztherapie. Sowohl nach zunächst erfolgreicher hormoneller als auch chirurgischer Behandlung kommt es jedoch in bis zu 45 % der Fälle zu Rezidiven innerhalb von fünf Jahren (Evers et al. 1991, Wheeler et al. 1983). Da die Pathogenese der Endometriose noch weitgehend ungeklärt ist, kommt derzeit noch keine kausale Therapie zum Einsatz.

1.1.7.1 Operative Therapie

Ziel der operativen Therapie ist es, neben der histologischen Sicherung der Diagnose, alle Endometrioseherde zu entfernen und die anatomischen Verhältnisse des inneren Genitales zu rekonstruieren. Dabei können die Herde reseziert oder destruiert werden (Keckstein 1999, Kennedy et al. 2005). Von der Qualität der Primäroperation hängt der weitere Krankheitsverlauf und Therapieerfolg ab (Ebert 2006).

1.1.7.2 Hormonelle Therapie

Die Endometriose ist eine östrogenabhängige Erkrankung (Giudice et al. 2004) und so werden in der Therapie Substanzen eingesetzt, die eine antiöstrogene Wirkung haben. Prinzipiell kommen dabei Gestagene als Monotherapie oder in Form von Kombinationspräparaten als orale Kontrazeptiva, Danazol und Gonadotropin-Releasing-Hormone-Analoga zum Einsatz.

Gestagene wirken antigonadotrop und führen neben einer hypoöstrogenen Amenorrhoe zu einer Atrophie des Endometriums und der Endometrioseherde (Vercellini et al. 1997). Gestagene werden auch lokal über ein Intrauterinpressar angewendet (Maruo et al. 2001, Vercellini et al. 2005). Kombinierte orale Kontrazeptiva wirken ebenfalls antigonadotrop. Somit kommt es auch zur Suppression der ovariellen Östrogenproduktion und zur Dezidualisierung des Endometriums und der Endometrioseläsionen (Moore et al. 2000).

Danazol wirkt als Androgenderivat über eine moderate Hemmung der

hypothalamisch-hypophysären Achse. Dabei wird nur die zyklische Sekretion des Follikel-stimulierenden Hormons und des Luteinisierenden Hormons unterdrückt. Die Stimulierbarkeit der Hypophyse durch das Gonadotropin-Releasing-Hormone bleibt bestehen. Bei der Danazolgabe stehen der Östrogenentzug und die anabolen Mechanismen, also ein Anstieg des freien Testosterons im Vordergrund (Barbieri et al. 1981). Aufgrund seiner irreversiblen Nebenwirkungen wird Danazol aber kaum noch systemisch eingesetzt (Thode et al. 2006).

Im Gegensatz zum Danazol führen Gonadotropin-Releasing-Hormone-Analoga zu einer Down-Regulation des Gonadotropin-Releasing-Hormone-Rezeptors mit konsekutiver Suppression des Luteinisierenden Hormons und des Follikel-stimulierenden Hormons und sekundärer Anovulation. Der hypoöstrogene-hypoprogestagene Zustand, einer temporär-reversiblen Pseudomenopause entsprechend, ist fast immer von einer Amenorrhoe und einem Sistieren der Endometriose-bedingten Beschwerden begleitet (Fedele et al. 1988).

1.1.7.3 Schmerztherapie

Bei der symptomatischen Therapie der Endometriose kommen Nichtsteroidale Antiphlogistika zum Einsatz (Kennedy et al. 2005). Nichtsteroidale Antiphlogistika wirken über eine Hemmung der Prostaglandinsynthese analgetisch. Zusätzlich wird ein Effekt über die Ausschüttung von körpereigenen Opioiden diskutiert (Hanna et al. 2003). Es ist gezeigt worden, dass Nichtsteroidale Antiphlogistika Dysmenorrhoe lindern können (Marjoribanks et al. 2003). Dass Nichtsteroidale Antiphlogistika in der Endometriosetherapie effektiv sind, konnte jedoch bisher nicht eindeutig gezeigt werden (Allen et al. 2005).

1.2 Endometriose und Nerven

Die Frage nach dem Mechanismus der Schmerzentstehung ist nach wie vor nicht eindeutig zu beantworten. Insbesondere, da die Schmerzsymptomatik nicht mit dem Stadium der Erkrankung korreliert (Szendei et al. 2005, Vercellini et al. 1996) und identische Läsionen bei symptomatischen und asymptomatischen Endometriosepatientinnen gefunden werden können (Whiteside et al. 2003).

Bekannt ist, dass aktive Endometrioseläsionen sowohl Prostaglandin E₂ und F_{2α} (Dawood et al. 1984, Wu et al. 2007) als auch Entzündungsmediatoren, wie Interleukin-1, 6, 8, 10, Tumornekrosefaktor-α (Wu et al. 2003) und Histamine synthetisieren. Diese Stoffe können freie Nervenendigungen, sogenannte Nozizeptoren, aktivieren und so das Schmerzereignis an zentrale Ebenen weiterleiten (Apfel 2000, Mantyh 2002, Schaible et al. 2002).

Die topographischen Beziehungen der Endometrioseläsionen zu den umliegenden Nerven des sensibel innervierten parietalen Peritoneums (Vercellini 1997) wurden bisher kaum untersucht. In ersten Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Nervenanzahl zwischen gesundem Peritoneum und dem Peritoneum von an Endometriose erkrankten Frauen festgestellt werden. Es wurde lediglich beschrieben, dass bei Patientinnen mit Schmerzen die Nerven näher an der Läsion lokalisiert zu sein scheinen (Tulandi et al. 2001). In rektovaginalen Endometrioseherden unterschied sich abhängig vom präoperativen Pain-Score jedoch die Nervenanzahl in rektovaginalen Endometriosen bei 28 untersuchten Patientinnen. So konnten bei Patientinnen mit einem höheren präoperativen Pain-Score im Durchschnitt mehr Nerven in den rektovaginalen Endometrioseläsionen nachgewiesen werden als bei Patientinnen mit einem niedrigeren präoperativen Pain-Score (Anaf et al. 2000). Diese Nerven exprimierten Tyrosinkinase A. Tyrosinkinase A ist ein spezifischer Rezeptor für den Nerve Growth Factor, einem Nervenwachstumsfaktor (Anaf et al. 2002). Dabei war die histochemische Expression von Nerve Growth Factor in rektovaginalen Endometriosen signifikant höher als in ovariellen und peritonealen Endometrioseläsionen (Anaf et al. 2002). Es wurde auch gezeigt, dass Nerven in der Nähe von peritonealen Endometrioseherden Transforming Growth Factor β 1, einen wichtigen Neuromodulator (Chin et al. 2006), exprimieren. Dabei war die Transforming-Growth-Factor- β 1-Expression abhängig vom Schweregrad der Dysmenorrhoe der Endometriosepatientinnen (Tamburro et al. 2003). Im Jahr 2006 konnten Nervenfasern in peritonealen und ovariellen Endometrioseläsionen von 49 Patientinnen gezeigt werden, die Marker für sensible A δ , sensible C, cholinerge und adrenerge Fasern exprimieren (Tokushige et al. 2006).

Unklar bleibt bisher, ob es sich bei den beschriebenen Nerven um präexistente oder neu entstandene Nervenfasern handelt, die einen pathogenetischen Einfluss auf die Endometriose-assoziierten Unterbauchschmerzen haben könnten. In einem chirurgisch induzierten Rattenendometriosemodell wurde gezeigt, dass transplantiertes Endometrium eine eigene autonome und sympathische Innervation entwickelt (Berkley et al. 2004).

2 Ziel der Untersuchungen

Daher war es Ziel dieser Untersuchungen, Nervenfasern systematisch in den Endometrioseläsionen nachzuweisen und die histomorphologischen Beziehungen zwischen peritonealen Endometrioseläsionen und den umliegenden Nervenfasern zu untersuchen. Die Qualität dieser Nervenfasern sollte charakterisiert werden.

Um herauszufinden, ob es sich um präexistente oder neu entstandene Nervenfasern handelt, sollten deren Vaskularisation und deren Expression von Nervenwachstumsmarkern untersucht werden. Zusätzlich sollte die Expression von Nervenwachstumsfaktoren im Endometriosegewebe, in der Douglasflüssigkeit von Endometriosepatientinnen und in Endometriosezellkulturen untersucht werden.

Zudem war es Ziel der Untersuchungen, ein In-vitro-Modell zur Interaktionsanalyse zwischen Endometriose- und Nervenzellen zu etablieren, um zu zeigen, dass Endometriosezellen neurotrophe Eigenschaften besitzen.

3 Material und Methoden

3.1 Patientinnen

73 Patientinnen wurden ausschließlich wegen einer symptomatischen Endometriose mit Beschwerden wie Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhoe, Dyschezie und Dyspareunie im Zeitraum von Juli 2000 bis Oktober 2003 laparoskopiert oder laparotomiert. Die Patientinnen waren im Mittel 31 Jahre alt (Range 19-47). Als Kontrollgruppe wurden 9 Patientinnen ohne Endometriose und ohne ein entzündliches Geschehen, zum Beispiel wegen Myomen oder zur Sterilisation laparoskopiert oder laparotomiert. Die jeweiligen Zyklusphasen der Patientinnen wurden durch Korrelation des angegebenen Datums der letzten Menstruation und des histologischen Befunds des Endometriums, bestimmt nach Dallenbach-Hellweg, ermittelt. Die Stadieneinteilung der Endometriose wurde nach der überarbeiteten Klassifikation der American Society of Reproductive Medicine rASRM (1997) vorgenommen. Patientinnen mit zusätzlich malignen Tumoren wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die klinischen Daten der Patientinnen wurden im Endometriosezentrum Berlin, Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (Leiter: Professor Dr. Dr. Dr. A. D. Ebert) erhoben. (Tabelle 1)

Klinische Daten		Anzahl	Spalten%
rASRM Stadium	keine Angabe	3	4,1%
	rASRM I	28	38,4%
	rASRM II	16	21,9%
	rASRM III	13	17,8%
	rASRM IV	13	17,8%
Zyklusphase	keine Angabe	6	8,2%
	Proliferationsphase	32	43,8%
	Sekretionsphase	27	37,0%
	Oligomenorrhoe	4	5,5%
	Amenorrhoe	4	5,5%
Unterbauchschmerzen	keine Angabe	5	6,8%
	ja	49	67,1%
	nein	19	26,0%
Dysmenorrhoe	keine Angabe	4	5,5%
	ja	57	78,1%
	nein	12	16,4%
Dyspareunie	keine Angabe	6	8,2%
	ja	42	57,5%
	nein	25	34,2%
Dysurie	keine Angabe	4	5,5%
	ja	8	11,0%
	nein	61	83,6%
Dysschezie	keine Angabe	5	6,8%
	ja	15	20,5%
	nein	53	72,6%
Parität	keine Angabe	2	2,7%
	Nullipara	55	75,3%
	Para	16	21,9%

Tabelle 1. Klinische Daten der Endometriosepatientinnen

3.2 Probengewinnung

Die Patientinnen wurden über die Studie aufgeklärt. Die Studie wurde der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vorgelegt und von dieser genehmigt. Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden 106 peritoneale Endometrioseläsionen

analysiert. Dafür wurden 38 Läsionen des Blasendaches, 18 Läsionen im Douglasraum, 16 Läsionen in der Fossa ovarica, 11 Läsionen an den Sacrouterinligamenten, eine Läsion des Ligamentum rotundum, 13 Läsionen an der seitlichen Beckenwand und 9 Läsionen der Serosa des Uterus und der Adnexe entnommen und sofort in 4%iger Paraformaldehydlösung für 12 Stunden fixiert und in Paraffin eingebettet. Zusätzlich wurden 9 peritoneale Proben an Endometriose-typischen Stellen von Patientinnen, die wegen einer anderen benignen gynäkologischen Erkrankung, wie Uterus myomatosus, ohne Endometriose operiert worden sind, entnommen und zu Kontrollzwecken verwendet. Alle entnommenen Proben waren durch subperitoneales Fettgewebe begrenzt. Des Weiteren wurden Anteile von 3 ovariellen Endometriosezysten, eine peritoneale Endometrioseläsion und 4 rektovaginale Endometrioseherde für das Anlegen von Primärzellkulturen eingesetzt und unmittelbar nach Entnahme unter sterilen Bedingungen in Kultur genommen. 3 ovarielle Endometriosezysten, 3 peritoneale Endometrioseläsionen und 2 rektovaginale Endometrioseherde wurden für proteinchemische Untersuchungen verwendet. Außerdem wurde die Douglasflüssigkeit von 7 Endometriosepatientinnen und einer Patientin ohne Endometriose gewonnen und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

3.3.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Für die Untersuchungen zur Lokalisation von Antigenen im Endometriosegewebe wurden Paraffinschnitte verwendet. Zur Herstellung wurde das Gewebe in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom HM 400R (MICROM International GmbH, Walldorf) 2-5 µm dicke Stufenschnitte angefertigt und auf Objektträger SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht. Diese Schnitte wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und dann bei Bedarf mehrere Wochen bei 4 °C gelagert oder sofort für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet.

3.3.2 Entparaffinierung

Nach völligem Trocknen und nach Koagulation des Eiweißes im Trockenschrank (Ehret, Emmendingen) bei 60 °C für 120 Minuten wurden die Paraffinschnitte zum Herauslösen des Paraffins 2-mal 5 Minuten in Xylol (J.T. Baker, Deventer, Holland) gestellt. Danach wurden sie jeweils 10 Minuten in Aceton (J.T. Baker, Deventer, Holland), im Aceton (J.T. Baker, Deventer, Holland)-TRIS-Puffer-Gemisch (1:1) und schließlich in TRIS-Puffer rehydriert. Die Schnitte standen nun für die Färbungen zur Verfügung.

3.3.3 Antigen-Demaskierungsverfahren am Gewebeschnitt

Zur Antigen-Demaskierung wurde eine Mikrowellenvorbehandlung der Schnitte durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurden die Schnitte auf den Objektträgern SuperFrost[®] Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig) in Küvetten gestellt, diese mit einem 0,1 M Citratpuffer, pH 6,0 aufgefüllt und für 17 Minuten in der Mikrowelle Typ SS-578H (Robert Bosch Hausgeräte GmbH, Stuttgart) bei 700 Watt gekocht. Nach der Erhitzung wurden die Gewebeschnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen, bevor dann zügig mit der immunhistochemischen Färbung oder der Immunfluoreszenz fortgeföhren werden konnte.

3.3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.3.4.1 Neurofilamentfärbung

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit Fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde das überschüssige Fetale Kälberserum (Biochrom, Berlin) vom Schnitt abgeklopft und anschließend der Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-anti-Neurofilament-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:50 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in einer selbst gebauten feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte zehnmal mit TRIS-Puffer gespült und mit dem DAKO LSAB[®]+ System, AP (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TRIS-Puffer wurde die Antigenbindung mit dem Fuchsin-Substrate-Chromogen-System (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) visualisiert. Abschließend wurde mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) für 25 Sekunden gegengefärbt und die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch TRIS-Puffer ersetzt. Als Positivkontrollen wurden Gewebeschnitte von peripheren Nerven verwendet. Zur Auswertung der Färbung wurden die Schnitte unter dem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) beurteilt und mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert. Es wurden alle Nervenfasern im Schnitt gezählt, speziell die Nervenfasern, die sich im Stroma der Endometrioseläsion bzw. bis zu 1,5 Millimeter vom Epithel der Läsion entfernt befanden. Dazu wurde eine selbst angefertigte Skala benutzt.

3.3.4.2 Nerve-Growth-Factor-Färbung

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit Dako[®] Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend der Primärantikörper, ein polyklonaler Kaninchen-anti-Nerve-Growth-Factor-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 1:100 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in der selbst gebauten feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem Biotin-SP-konjugierten Maus-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:400 in TRIS-Puffer verdünnt, für 45 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit Alkalische-Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim), verdünnt 1:400 in TRIS-Puffer, für weitere 40 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TRIS-Puffer wurde die Antigenbindung mit dem Fuchsin-Substrate-Chromogen-System (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) visualisiert. Abschließend wurde mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) für 25 Sekunden gegengefärbt und die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch TRIS-Puffer ersetzt. Zur Auswertung der Färbung wurden die Schnitte unter dem AxioPhot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert, mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert und die Intensität der Färbung im Epithel und im Stroma beurteilt. Dabei wurde zwischen keiner, geringer, mittlerer und starker Farbtintensität unterschieden.

3.3.4.3 Neurotrophin-3-Färbung

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit Dako[®] Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend der Primärantikörper, ein polyklonaler Ziegen-anti-Neurotrophin-3-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 1:100 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background

Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in der selbst gebauten feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem Biotin-SP-konjugierten Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:400 in TRIS-Puffer verdünnt, für 45 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit Alkalische-Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim), verdünnt 1:400 in TRIS-Puffer, für weitere 40 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TRIS-Puffer wurde die Antigenbindung mit dem Fuchsin-Substrate-Chromogen-System (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) visualisiert. Abschließend wurde mit Mayers Hämalanlösung (Merck, Darmstadt) für 25 Sekunden gegengefärbt und die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch TRIS-Puffer ersetzt. Zur Auswertung der Färbung wurden die Schnitte unter dem AxioPhot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert, mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert und die Intensität der Färbung im Epithel und im Stroma beurteilt. Dabei wurde zwischen keiner, geringer, mittlerer und starker Farbintensität unterschieden.

3.3.4.4 Growth-Associated-Protein-43-Färbung

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit Dako[®] Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend der Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-anti-Growth-Associated-Protein-43-Antikörper (SIGMA, Saint Luis, USA), 1:200 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in der selbst gebauten feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem Biotin-SP-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:400 in TRIS-Puffer verdünnt, für 45 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit Alkalische-Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin (Roche Diagnostics, Mannheim), verdünnt 1:400 in TRIS-Puffer, für weitere 40 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TRIS-Puffer wurde die

Antigenbindung mit dem Fuchsin-Substrate-Chromogen-System (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) visualisiert. Abschließend wurde mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) für 25 Sekunden gegengefärbt und die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch TRIS-Puffer ersetzt. Periphere Neurinome wurden als Positivkontrolle verwendet. Zur Auswertung der Färbung wurden die Schnitte unter dem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert, mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert und die Intensität der Färbung in den Nervenfasern beurteilt. Dabei wurde zwischen einer geringen, mittleren und starken Färbung der Nervenfasern unterschieden.

3.3.5 Immunfluoreszenz-Färbungen

3.3.5.1 Neurofilament- und Substanz-P-Doppelfärbung

Die Schnitte wurden zur zusätzlichen Antigen-Demaskierung nach der Mikrowellenbehandlung 3 Minuten mit Proteinase K (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) vorbehandelt. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit Fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend wurde der monoklonale Maus-anti-Neurofilament-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:50 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in der selbst gebauten feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem CyTM2-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:100 in TRIS-Puffer verdünnt, für 45 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend wurde der monoklonale Ratte-anti-Substanz-P-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 1:50 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem Rhodamine-RedTM-X-konjugierten Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:100 in TRIS-Puffer verdünnt, für

45 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Abschließend wurde mit Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gegengefärbt und die Schnitte wurden mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch TRIS-Puffer ersetzt. Gewebeschnitte vom Kolon wurden als Positivkontrolle verwendet. Zur Auswertung wurden die Schnitte unter dem AxioPhot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert und mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert. Es wurde zwischen vorhandener und nicht vorhandener Färbung der Nervenfasern unterschieden.

3.3.5.2 Neurofilament-, von-Willebrand-Faktor- und Smooth-Muscle-Actin-Dreifachfärbung

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Gewebeschnitte nach dem Antigen-Demaskierungsverfahren mit Fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend wurde der monoklonale Maus-anti-Neurofilament-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:50 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in einer selbst gebauten feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem CyTM2-konjugierten F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:25 in TRIS-Puffer verdünnt, für 45 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und anschließend wurde der monoklonale Kaninchen-anti-Smooth-Muscle-Actin-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:50 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), und der Kaninchen-anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörper (SIGMA, Saint Luis, USA), 1:100 verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit den primären Antikörpern wurden die Schnitte mit TRIS-Puffer gespült und mit den Sekundärantikörpern, einem Rhodamine-RedTM-X-konjugierten Ziege-anti-Ratte-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:100 in TRIS-Puffer verdünnt, und einem AMCA-konjugierten Esel-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:100 in TRIS-Puffer verdünnt, für 45 Minuten in der

feuchten Kammer inkubiert. Abschließend wurde mit Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gegengefärbt und die Schnitte wurden mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch TRIS-Puffer ersetzt. Gewebeschnitte vom Uterus wurden als Positivkontrolle verwendet. Zur Auswertung der Färbung wurden die Schnitte unter dem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert und mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert. Es wurde zwischen reifen und unreifen Gefäßen unterschieden.

3.4 Endometriose-Zellkultur

3.4.1 Zelllinien

Für die Untersuchungen wurde die Endometriosezelllinie 12Z, die freundlicherweise von Frau Professorin Dr. Anna Starzinski-Powitz, Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität, Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Diese Zelllinie wurde in Endometriosemedium im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Das Endometriosemedium wurde dabei alle 48 Stunden abgesaugt und durch frisches Endometriosemedium ersetzt.

3.4.2 Gewinnung und Kultivierung von primären Endometriosekulturen

Unmittelbar nach der operativen Entnahme wurden die Endometriosegewebeproben unter sterilen Bedingungen in Endometriosemedium gegeben. Für die Herstellung von Primärkulturen wurden die Endometrioseläsionen zunächst mit PBS (pH 7,4) gewaschen, zerkleinert und die Gewebesuspension mit 20 ml Enzymmix versetzt. Das Gewebe wurde bei 37 °C im Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel) für 45 Minuten verdaut. Anschließend wurde der Ansatz mit 20 ml Endometriosemedium verdünnt und bei 1800 rpm für 10 Minuten in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Endometriosemedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch 2-mal wiederholt. Dann wurden die Zellen in 10 ml Endometriosemedium resuspendiert und in eine Nunc-EasyFlaskTM-75-cm³-Kulturflasche (Nunc, Wiesbaden) gegeben und im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Das Endometriosemedium wurde dabei alle 48 Stunden abgesaugt und durch frisches Endometriosemedium ersetzt. Die Mischkultur wurde in vorangegangenen Untersuchungen

charakterisiert. Es zeigten sich einerseits Epithelzellen, die den Epithelmarker Cytokeratin (Prieto et al. 1996) und Stromazellen, die den Stromamarker Vimentin (Mai et al. 1997) exprimierten.

3.4.3 Passagierung

Nachdem ein Konfluenzgrad von ca. 80-90 % erreicht war, wurden die Endometriosezellen mit PBS gespült und mit je 2 ml Trypsin/EDTA Solution in PBS 0,05 %/0,02 % (w/v) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom, Berlin) pro Nunc-EasyFlask™-75-cm³-Kulturflasche (Nunc, Wiesbaden) bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Durch Zugabe von Endometriosemedium wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Zellsuspension bei 1800 rpm für 10 Minuten in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Endometriosemedium resuspendiert und auf zwei Nunc-EasyFlask™-75-cm³-Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) aufgeteilt. Da die Epithelzellen von den Stromazellen schnell überwachsen wurden und der Charakter der Mischkultur verloren ging, wurden die primären Endometriosezellkulturen nicht mehr als 3-mal passagiert.

3.4.4 Gewinnung von Konditionierten Versuchsmedien

Nachdem ein Konfluenzgrad von ca. 80-90 % erreicht war wurden die Endometriosezellkulturen 2-mal mit PBS gespült und für 48 Stunden im Versuchsmedium kultiviert. Das Konditionierte Versuchsmedium wurde abpipettiert und bei 1800 rpm für 10 Minuten in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand konnte bei Bedarf bei -80 °C gelagert werden oder wurde direkt im Neuronal Growth Assay verwendet.

3.5 Immunfluoreszenz an fixierten Endometriosezellen

3.5.1 Kultivierung, Fixierung und Permeabilisierung der Endometriosezellen

Für die Immunfluoreszenz an Endometriosezellen wurden die Endometriosezellen einer Kulturflasche mit einem Konfluenzgrad von 80-90 % mit PBS gespült und mit 2 ml Trypsin/EDTA Solution in PBS 0,05 %/0,02 % (w/v) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} (Biochrom, Berlin) bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Durch Zugabe von Endometriosemedium wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Zellsuspension bei 1800 rpm für 10 Minuten in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Endometriosemedium resuspendiert. Jeweils ein Tropfen der Zellsuspension wurde auf ein Deckgläschen 21x26 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig) gegeben. Die Zellen wurden auf den Deckgläschen 21x26 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig)

für weitere 48 Stunden im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C und unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Die auf den Deckgläschen 21x26 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig) gewachsenen Endometriosezellen wurden mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden sie 10 Minuten mit 20%iger Paraformaldehydlösung inkubiert. Anschließend wurde 3-mal mit PBS gespült. Um die Zellmembran zu permeabilisieren und somit für die Antikörper durchgängig zu machen, wurden die Zellen mit 0,1%iger Triton-X-100-Lösung für 10 Minuten inkubiert und anschließend erneut 3-mal mit PBS gewaschen.

3.5.2 Nerve-Growth-Factor- und Vimentin- oder Cytokeratin-Doppelfärbung

Um unspezifische Bindungen abzublocken, wurden die Zellen mit Dako[®] Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten vorinkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem Gemisch der jeweiligen primären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es wurden der polyklonale Kaninchen-anti-Nerve-Growth-Factor-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1:100 und der monoklonale Maus-anti-Cytokeratin-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) 1:100 oder der monoklonale Maus-anti-Vimentin-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1:100, verdünnt in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgetragen. Anschließend wurde 3-mal mit PBS gewaschen, bevor dann die Zellen für 1 Stunde mit dem Gemisch der beiden Sekundärantikörper, bestehend aus den CyTM2-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpern (Dianova, Hamburg) 1:100 und den Rhodamine-RedTM-X-konjugierten Esel-anti-Kaninchen-Antikörpern (Dianova, Hamburg) 1:100, in PBS verdünnt, bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne mit Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) angefärbt und die Zellen mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckelt. Die Detektion der Proteine erfolgte unter dem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) und die Zellen wurden mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert. Es wurde zwischen vorhandener und nicht vorhandener Färbung unterschieden.

3.6 Proteinbiochemische Untersuchungen

3.6.1 Proteinpräparation

3.6.1.1 Herstellung von Gewebhomogenaten für den Western Blot

Die Endometrioseläsionen wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in

Lebermedium auf Eis gestellt bzw. tiefgefroren. Das Gewebe wurde mit Plastipur[®] isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) abgespült und homogenisiert. Dazu wurden die Endometrioseläsionen in Lebermedium (5 ml/g Frischgewicht) mit dem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen) zerkleinert. Anschließend wurden alle Homogenate in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) bei 20.000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Die Pellets enthielten die Rohmembranfraktionen, die Überstände lösliche, zumeist zytosolische Proteine. Für die weiteren proteinchemischen Untersuchungen wurden die im Überstand gelösten zytosolischen Proteine verwendet.

3.6.1.2 Herstellung von Zellysaten für den Western Blot

Nachdem die primären Endometriosezellkulturen und die Endometriosezelllinie 12Z einen Konfluenzgrad von ca. 80-90 % erreicht hatten, wurden sie zunächst 3-mal mit PBS gespült und anschließend mit Lysepuffer 20 Minuten unter sanftem Schütteln abgebaut. Hierbei wurde für die Primärzellen der Mammalian Protein Extraction Buffer (300 µl pro 75-cm³-Kulturflasche) (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet, wohingegen die 12Z mit CMR-Puffer (200 µl pro 75-cm³-Kulturflasche) lysiert wurden. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben mithilfe eines Zellschabers (Nunc, Wiesbaden) von der Kulturflasche vollständig abgekratzt und mittels einer Eppendorf-Pipette (1 mL) (Eppendorf, Hamburg) mechanisch durch Aufsaugen und Ablassen homogenisiert. Nachfolgendes Zentrifugieren in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) bei 15.000 rpm für 15 Minuten sorgte für eine Abtrennung der löslichen Proteinfraction von Zelltrümmern bzw. Abbauresten im Pellet, das verworfen wurde. Eine Lagerung des Lysates war bei -80 °C möglich.

3.6.1.3 Vorbereitung der Douglasflüssigkeiten und Konditionierten Versuchsmedien für den Western Blot

Die im Operationssaal entnommenen Douglasflüssigkeiten und die gewonnenen Konditionierten Versuchsmedien wurden bei 15.000 rpm für 15 Minuten in der Ultrazentrifuge Optima L-90K (Heraeus, Hanau) abzentrifugiert und konnten bei Bedarf bei -80 °C gelagert oder sofort für die proteinchemischen Untersuchungen verwendet werden.

3.6.2 Proteinbestimmung

Um im Western Blot die Stärke der Banden vergleichen zu können, müssen alle Proben auf die gleiche Gesamtproteinkonzentrationen eingestellt werden. Dazu wurde eine 3-malige Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels des BCA[™] Protein Assay Reagent Kit (Pierce,

Rockford, IL, USA) mit BSA (Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich) als Referenzstandard vorgenommen.

3.6.3 Reduktion

Jeweils 30 µg der Proteinprobe, sowie 30 µg der Positivkontrollen, Zellysate der Zelllinien MCF-7 (Dolle et al. 2003) wurden im Verhältnis 1:4 in NovexTM Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Herstelleranweisung verdünnt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und weiterverarbeitet.

3.6.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach dem Auftragen der Proben in NuPageTM-10 %-Bis-Tris-Gele (Invitrogen, Carlsbad, USA) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der enthaltenen Proteine bei 200 Volt für 35 Minuten im XCell SureLockTM Mini-Cell (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Für die Elektrophorese wurde mit Aqua dest. verdünnter NuPage[®] MES SDS Running Buffer (20x) (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Als molekularer Massenstandard wurde der Full Range RainbowTM Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet.

3.6.5 Western Blot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nun zur Immunodetektion auf Nitrocellulosemembranen (Protan[®], Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurde das NuPageTM-10-% Bis-Tris-Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) im Transferpuffer zur Vermeidung der Austrocknung und Luftblasenbildung erst auf Filterpapier gelegt, dann mit der Nitrocellulosemembran (Protan[®], Schleicher & Schüll, Dassel) überdeckt und als sogenanntes „Sandwich“ in die Blotting-Einheit (Bio-Rad, München) gebracht. Unter Wasserkühlung erfolgte die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembranen (Protan[®], Schleicher & Schüll, Dassel) im Transferpuffer bei 100 Volt für 2 Stunden im XCell IITM Blot Module Kit CE Mark (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Die Nitrocellulosemembranen (Protan[®], Schleicher & Schüll, Dassel) wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2 Stunden in 10%ige Trockenmilchlösung gegeben und anschließend mit dem Primärantikörper, einem polyklonalen Kaninchen-anti-Nerve-Growth-Factor-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), 1:500 verdünnt in 5%iger Trockenmilchlösung, über Nacht bei 4-8 °C inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurden die Membranen 3-mal 10 Minuten mit einem Waschpuffer gespült und anschließend mit dem Sekundärantikörper, einem Peroxidasegekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg), der im Verhältnis 1:5.000 in

5%iger fettfreier Trockenmilch (Non-Fat Dry Milk) (Bio-Rad, München) verdünnt wurde, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut 3-mal 10 Minuten mit dem Waschpuffer gespült. Dann wurde die Nitrocellulosemembran (Protan[®], Schleicher & Schüll, Dassel) mit dem ECL[™] Western Blotting Detection Reagent Kit (Amersham, Braunschweig) für eine Minute inkubiert. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm Hyperfilm[™] ECL (Amersham, Braunschweig) für 10 Minuten aufgelegt.

3.7 Neuronal Growth Assay

Es wurde ein Modell, in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten, die neurotrophe Wirkungen auf Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen untersuchten, verwendet (Bryce et al. 1993, Levi-Montalcini et al. 1968, Rochat et al. 1988, Shah et al. 2004).

3.7.1 Lagerung und Bebrüten der Eier

Die befruchteten Valo-SPF-Eier (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) wurden zwischen Lieferung und Bebrüten in einem Kühlschrank bei 14 °C aufbewahrt. Dann wurden sie in der Brutmaschine Modell 3000 (Brutmaschinen-Jane Schütz GmbH, Hammelburg) mit motorisierter Eierwendung bei einer Luftfeuchtigkeit von ungefähr 80 % für 10 Tage angebrütet.

3.7.2 Präparation der Hinterwurzelganglien

Die Eier wurden mit Alkohol gereinigt und mit einer großen Pinzette am stumpfen Ende geöffnet. Die Embryonen wurden mit einer gebogenen Pinzette herausgenommen und in eine Petrischale mit eiskaltem PBS gelegt und sofort dekapitiert. Der Körper wurde dann in eine weitere Schale mit eisgekühltem PBS gelegt. Dann wurden die Hinterwurzelganglien unter dem Binokular Wild M8 (Wild Heerbrugg, Schweiz) präpariert. Dazu wurden die Hühnerembryonenkörper, mit dem Bauch nach oben, in einem Tropfen PBS auf einer sterilen angerauten Glasplatte unter das Binokular Wild M8 (Wild Heerbrugg, Schweiz) gelegt, der Bauch längs eröffnet und die Organe kopfwärts geschoben, um die Lendenwirbelsäule freizulegen. Die Hinterwurzelganglien liegen rechts und links der Wirbelkörperanlagen und können mit einer sehr feinen Pinzette gefasst und in einem PBS-Tropfen gesammelt werden. Die Hinterwurzelganglien wurden in dem PBS-Tropfen von eventuell verbliebenen Nervenstümpfen und Bindegewebsresten befreit.

3.7.3 Versuchsaufbau

Je ein Ganglion wurde dann in eine Kammer eines achtkammerigen Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] System (Nalge Nunc International, Naperville, USA) gegeben. Diese wurden zuvor beschichtet.

Dazu wurden die Kammern kurz mit Collagen G (Biochrom, Berlin), 1:5 in sterilem Wasser verdünnt, inkubiert, die Lösung abgesaugt und einmal mit sterilem Wasser gespült. Zu den Ganglien wurde dann entweder nur Versuchsmedium als Negativkontrolle, Versuchsmedium mit 100 ng/ml Nerve Growth Factor-2.5S (Sigma-Aldrich, München) als Positivkontrolle oder Konditioniertes Versuchsmedium einer primären Endometriosezellkultur gegeben und so für 48 Stunden im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

3.7.4 Auswertung

Nach 48 Stunden wurden die Ganglien unter dem Axiovert-25-Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert und der Versuch beendet. Anhand der Fotografien wurden die Ganglien dann bezüglich ihrer Aussprossung mithilfe einer Skala von 0 bis 3 beurteilt. Wobei kein Aussprossen mit einer 0, das Auswachsen vereinzelter Nervenfasern mit einer 1, ein Zellsaum von mehr als einem Viertel des Gangliendurchmessers um das Ganglion mit einer 2 und ein Zellsaum von mehr als der Hälfte des Gangliendurchmessers um das Ganglion mit einer 3 bewertet wurde. Jedes Konditionierte Versuchsmedium wurde in drei unabhängigen Versuchen getestet und der Score im Durchschnitt bestimmt.

3.7.5 Immunfluoreszenz an fixierten Ganglien

3.7.5.1 Fixierung der Ganglien

Nach dem Fotografieren wurden die Versuchsmedien sehr vorsichtig aus dem Lab-Tek® Chamber Slide™ System (Nalge Nunc International, Naperville, USA) gekippt und die Ganglien 2-mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Ganglien für 20 Minuten mit 200 µl einer 20%igen Paraformaldehydlösung pro Kammer inkubiert. Um die Zellmembran zu permeabilisieren und somit für die Antikörper durchgängig zu machen, wurden die Ganglien für 20 Minuten mit je 200 µl 0,2%iger Triton-X-100-Lösung in PBS inkubiert. Dann konnten die Ganglien bei Bedarf bei -20 °C gelagert werden.

3.7.5.2 Neurofilamentfärbung der Ganglien

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Ganglien mit Dako® Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurde die Ganglien mit PBS gewaschen und anschließend wurde der monoklonale Maus-anti-Neurofilament-Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), 1:50 verdünnt in Dako® Antibody Diluent with

Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark), aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Ganglien mit PBS gespült und mit dem Sekundärantikörper, einem CyTM2-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:100 in Dako[®] Antibody Diluent with Background Reducing Agent (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) verdünnt, für 45 Minuten inkubiert. Danach wurden die Ganglien mit PBS gespült und abschließend mit Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gegengefärbt. Dann wurde der Kammeraufsatz des Lab-Tek[®] Chamber SlideTM System (Nalge Nunc International, Naperville, USA) entfernt und die gefärbten Ganglien wurden auf dem Objektträger mit Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, USA) eingedeckelt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse, aufgrund unspezifischer Antikörperbindung, wurden Negativkontrollen bei jedem Färbegang durchgeführt. Dazu wurde der Primärantikörper durch PBS ersetzt. Gewebeschnitte von peripheren Nerven wurden als Positivkontrolle verwendet. Zur Auswertung wurden die Schnitte unter dem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) analysiert und mit der Canon Power Shot G5 (Canon Deutschland GmbH, Krefeld) fotografiert. Es wurde beurteilt, ob sich im Zellsaum um das adhärenente Hinterwurzelganglion neben den Fibrozyten auch Nervenfasern befanden.

3.8 *Materialien*

3.8.1 **Geräte**

Gerätetyp	Hersteller
Accu Jet (Pipettierhilfe)	Brand, Wertheim
Analysenwaage Navigator TM	Ohaus, Giessen
Autoklav, Varioklav Typ 400	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Axiovert 25 Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bidestanlage GFL 2102	GFL, Burgwedel
Binokular Wild M8	Wild Heerbrugg, Schweiz
Blotting-Einheit	Bio-Rad, München
Brutmaschine Modell 3000	Brutmaschinen-Jane Schütz GmbH, Hammelburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau

Canon Power Shot G5	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Douncer	Zeiss, Jena
Flow bench NU 425-400	NuAire, Plymouth, MN, USA
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Taufen
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Schwabach
Mikroliterzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Walldorf
Mikrowelle Typ SS-578H	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, Stuttgart
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Power Ease Power Supply	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel
Schüttler 3005	GFL, Burgwedel
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Taufen
Schwenker Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu Europa, Duisburg
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge eppendorf centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Heraeus, Hanau
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
Universalzentrifuge Labofuge 400R, Rotor 70.1 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt
XCell II™ Blot Module Kit CE Mark	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.8.2 Gebrauchsfertige Materialien

3.8.2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Aerosol Resistant Tips	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
BCA™ Protein Assay Reagentkit	Pierce, Rockford, IL, USA
BSA	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
Calcium Chlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CMR Complete mini reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Collagen G	Biochrom, Berlin
DAKO LSAB®+ System, AP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako® Antibody Diluent with Background Reducing Agent	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Dako® Protein Block Serum-Free, Ready-to-Use	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen 21x26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
DermaClean, nicht sterile Einmal-Untersuchungshandschuhe	Ansell, München
Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Dispase 1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Disposable Scalpel sterile	Feather Safety Razor Co., pfm, Köln
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin
ECL™ Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Eppendorf T.I.P.S., verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg

Ethanol (96 %) reinst, Ethanol (70 %)	Merck, Darmstadt
Falcon Serologische Pipetten 1, 5, 10 und 25 mL	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Falcon Tubes 25 und 50 mL	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, AL, USA
Fuchsin Substrate-Chromogen-System	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Full Range Rainbow™ Molecular Weight Marker	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Hyperfilm™ ECL	Amersham, Braunschweig
Ipegal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kollagenase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lab-Tek® Chamber Slide™ System	Nalge Nunc International, Naperville, USA
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) min 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mammalian Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, IL, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nerve Growth Factor-2.5S	Sigma-Aldrich, München
Nitrocellulosemembranen	Protan®, Schleicher & Schüll, Dassel
Novex™ Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Nunc-EasyFlask™-75-cm ³ -Kulturflasche	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturschalen 8,8 und 21,5 cm ²	Nunc, Wiesbaden
NuPage® Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NuPage® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage™ 10 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Carlsbad, USA
Objekträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pasteur Pipetten	Brand GmbH + Co, Wertheim
PBS Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin 10000 U/10000 µg/mL	Biochrom, Berlin
Plastipur® isotonischer Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Polyethylenbecher	Plano, Wetzlar
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinase K	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co, Wertheim
Reporter Lysis Buffer 5x	Promega, Madison, WI, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodium Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Softa-Man®	Braun, Melsungen
Sterile Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter Millex® GP	Millipore, Bedford, MA, USA
Streptavidin-AP Coniugate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trisma [®] Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trisma [®] Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trockenmilchpulver (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad, München
Trypsin/EDTA Solution in PBS 0,05 %/0,02 % (w/v) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Tween [®] 20	Bio-Rad, München
Valo-SPF-Eier	Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Zellschaber, steril	Nunc, Wiesbaden
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

3.8.2.2 Antikörper

3.8.2.2.1 Primäre Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
Kaninchen-anti-von-Willebrand-Faktor	SIGMA, Saint Luis, USA
monoklonal Maus-anti-Cytokeration	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
monoklonal Maus-anti-Vimentin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
monoklonal Ratte-anti-Substanz-P	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
monoklonal Kaninchen-anti-Smooth-Muscle-Actin	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
monoklonal Maus-anti-Growth-Associated-Protein-43	SIGMA, Saint Luis, USA
monoklonal Maus-anti-Neurofilament	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
polyklonal Kaninchen-anti-Nerve-Growth-Factor	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
polyklonal Ziegen-anti-Neurotrophin-3	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

3.8.2.2.2 Sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper	Hersteller
AMCA-konjugiert Esel-anti-Maus	Dianova, Hamburg
Biotin-SP-konjugiert Kaninchen-anti-Maus	Dianova, Hamburg
Biotin-SP-konjugiert Kaninchen-anti-Ziege	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Biotin-SP-konjugiert Maus-anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Cy TM 2-konjugiertes F(ab') ₂ Fragment Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg
Cy TM 2-konjugiert Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg
Peroxidase gekoppelt Ziege-anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg
Rhodamine Red TM -X-konjugiert Esel-anti Kaninchen	Dianova, Hamburg
Rhodamine Red TM -X-konjugiert Ziege-anti-Ratte	Dianova, Hamburg

3.8.3 Medien

3.8.3.1 Endometriosemedium

Für die Kultivierung der primären Endometriomzellen und der 12Z-Endometriosezelllinie wurde Dulbecco's modified Eagle Medium (Biochrom, Berlin) mit folgenden Zusätzen verwendet:

Fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin)	10%
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg/mL) (Biochrom, Berlin)	1%
L-Glutamin (200 mM) (Biochrom, Berlin)	1%

3.8.3.2 Versuchsmedium

Für die Versuche des Neuronal Growth Assay und die Herstellung von Konditionierten Versuchsmedien wurde Dulbecco's Medium w/o Phenol Red (Gibco, Invitrogen Corporation) mit folgenden Zusätzen verwendet:

Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg/mL) (Biochrom, Berlin)	1%
L-Glutamin (200 mM) (Biochrom, Berlin)	1%

3.8.4 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Enzymix	0,5 mg Kollagenase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 0,33 mg Dispase 1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 20 ml PBS

4%ige/20%ige Paraformaldehydlösung	0,08 g/0,4 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) in 10 ml PBS
0,1%ige/0,2%ige Triton-X-100-Lösung	0,1 ml/0,2 ml Triton-X-100-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 100 ml PBS
5%ige/10%ige Trockenmilchlösung	5 g/10 g Trockenmilchpulver (Non-Fat Dry Milk) (Bio-Rad, München) in 100 ml PBS
Lebermedium	1,0 mM NaHCO ₃ 0,5 mM Calcium Chlorid (CaCl ₂) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

3.8.5 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Citratpuffer 10 mM pH 6,0	Lösung A: 21,01 g Zitronensäure (Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. Lösung B: 29,41 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. 18 ml Lösung A 82 ml Lösung B ad 1000 ml Aqua dest.
CMR Puffer	1 Tablette CMR Complete mini reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 5 µg 200 µM Natrium Orthovanadat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 10 µl Ipegal CA-630 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) ad 10 ml Tris-Puffer
PBS pH 7,6	PBS Dulbecco Instamed (Biochrom, Berlin, Deutschland) in Aqua dest.
Transferpuffer	50 ml NuPage [®] Transfer Buffer (20x) (Invitrogen, Carlsbad, USA) 200 ml Methanol (Merck, Darmstadt) in 750 ml Aqua bidest.

Tris-Puffer 50 mM pH 7,4-7,6	34,25 g Trizma [®] Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 4 g Trizma [®] Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 43,9 g Natriumchlorid (NaCl) min 99,5 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in 5000 ml Aqua dest. Die pH-Einstellung erfolgte mit Trizma [®] Hydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und Natronlauge (NaOH) (Merck, Darmstadt).
Waschpuffer	0,5 ml Tween [®] 20 (Bio-Rad, München) in 100 ml PBS

3.9 Statistik

Zur deskriptiven und statistischen Analyse der Daten wurde das SPSS-Programm (v11.5) verwendet. Statistische Zusammenhänge zwischen den klinischen Daten und Nervenfaserkontakten wurden mithilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht.

4 Resultate

4.1 Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen

4.1.1 Neurofilamentfärbung

Um die topographischen Beziehungen zwischen Endometriose und Nervenfasern zu untersuchen, wurden 106 zufällig ausgewählte peritoneale Endometrioseläsionen von 73 Patientinnen immunhistochemisch mit dem Antikörper gegen Neurofilament, einem Markermolekül für Nervenfasern, gefärbt. Die peritonealen Nerven wurden hinsichtlich ihrer Anzahl und ihrer Lokalisation im Bezug zur Endometrioseläsion ausgewertet.

In allen untersuchten peritonealen Proben konnten Nervenfasern nachgewiesen werden. Dabei wiesen von den 73 Endometriosepatientinnen 57 (77 %) Nervenfasern auf, die nicht weiter als 1,5 mm vom Epithel der Endometrioseläsion entfernt waren, also Kontakt mit der Endometrioseläsion hatten (Tabelle 2). Bei 32 (43,2 %) der untersuchten Patientinnen befanden sich Nervenfasern direkt im Stroma der Läsion (Abbildung 2). Bei 17 (23 %) der untersuchten Patientinnen konnten Nervenfasern nur mehr als 1,5 mm von der Endometrioseläsion entfernt, also ohne Kontakt zur Endometrioseläsion, gefunden werden.

Nervenfaserkontakte zu peritonealen Endometrioseläsionen				
	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig kein Kontakt	17	23,3	23,3	23,3
Kontakt	56	76,7	76,7	100,0
Gesamt	73	100,0	100,0	

Tabelle 2. Nervenfaserkontakte zu peritonealen Endometrioseläsionen

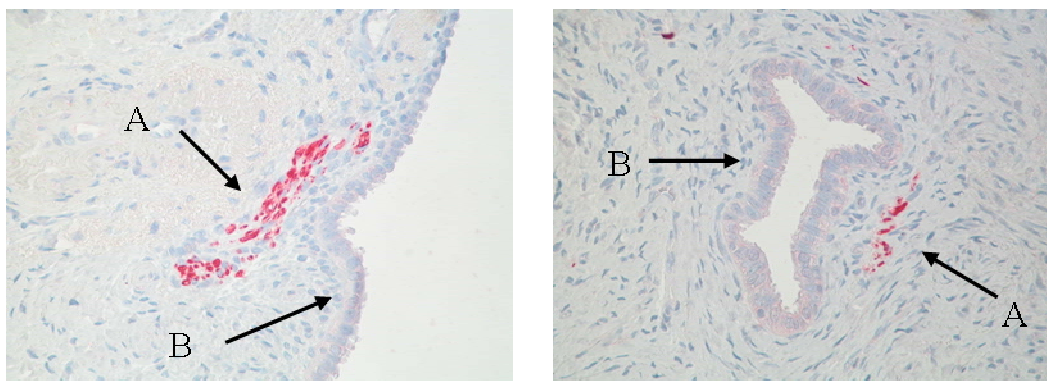


Abbildung 2. Färbung gegen Neurofilament (rot). Nervenfasern (A) im Stroma peritonealer Endometrioseläsionen (B). Vergrößerung: 400 x

Histomorphologisch fiel auf, dass die Nervenfasern in der Nähe von peritonealen Endometrioseläsionen zum Teil von den Stromazellen der Endometrioseläsion infiltriert zu sein schienen (Abbildung 3).

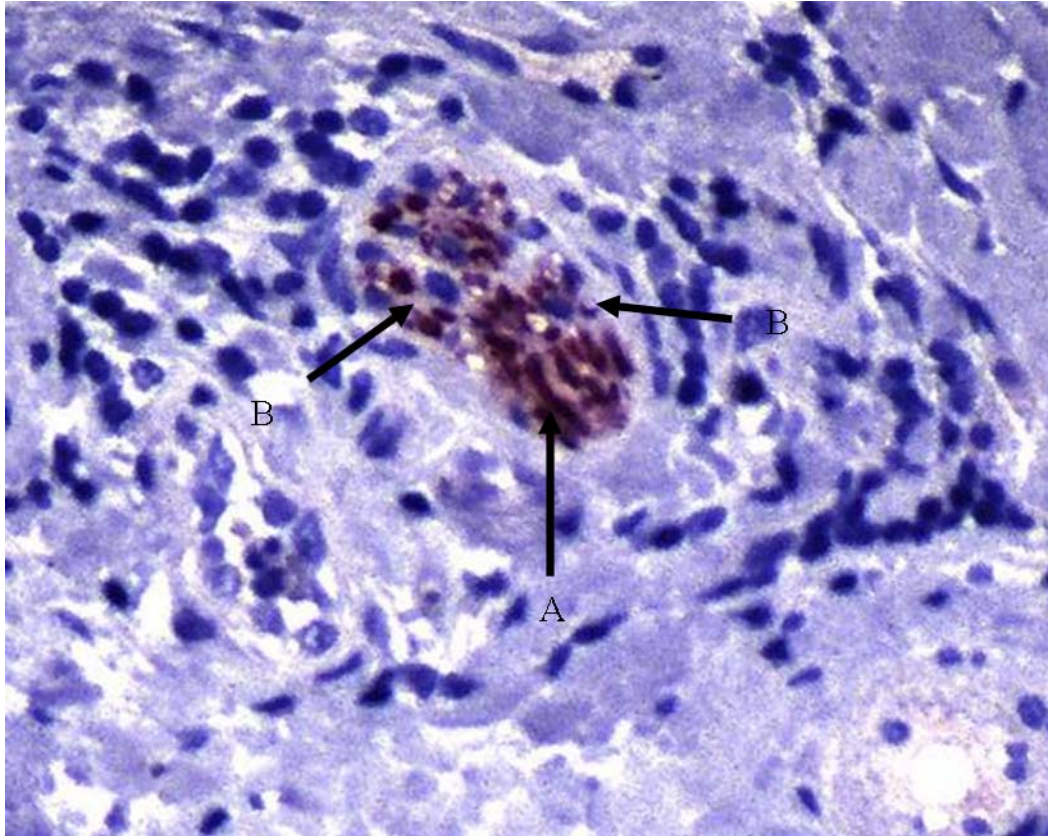


Abbildung 3. Färbung gegen Neurofilament (rot). Nerv (A) in der Nähe einer peritonealen Endometrioseläsion von Stromazellen (B) infiltriert. Vergrößerung: 400 x

Da die untersuchten Patientinnen alle Endometriose-assoziierte Beschwerden aufwiesen und nicht alle Endometrioseläsionen der jeweiligen Patientin untersucht werden konnten, konnte kein statistischer Zusammenhang zwischen Nervenfasern und der klinischen Symptomatik, wie Dysmenorrhoe und Unterbauchschmerzen oder zwischen Nervenfasern und dem rASRM Stadium festgestellt werden.

4.1.2 Neurofilament- und Substanz-P-Doppelfärbung

Zur weiteren Charakterisierung der Endometriose-assoziierten Nervenfasern, wurden 35 peritoneale Proben mit Endometrioseläsionen auf das Vorhandensein von Substanz P untersucht. Substanz P ist ein Marker für sensible Nerven (Sasamura et al., 1999).

Von den untersuchten peritonealen Proben mit Endometrioseläsionen wiesen 20 (57,1 %) Nerven mit Substanz-P-positiven Anteilen auf. In 10 (28,6 %) Fällen hatten die Nervenfasern mit Substanz-P-positiven Anteilen Kontakt mit der Endometrioseläsion, waren also nicht mehr als 1,5 mm von der Läsion entfernt (Abbildung 4).

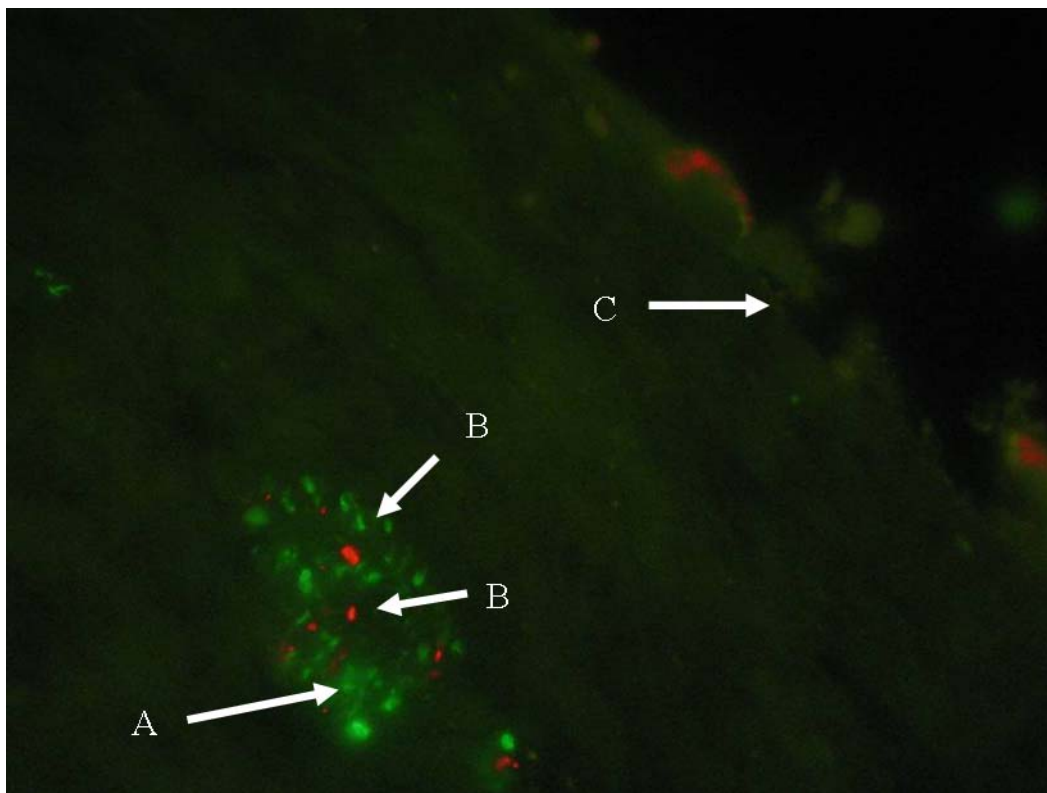


Abbildung 4. Doppelfärbung gegen Neurofilament (grün) und Substanz P (rot). Nerv (A) mit Substanz-P-positiven Anteilen (B) am Epithel (C) einer peritonealen Endometrioseläsion. Vergrößerung: 1000 x

4.2 Vaskularisation von Endometrioseherden – Neurofilament-, von-Willebrand-Faktor- und Smooth-Muscle-Actin-Dreifachfärbung

Die Vaskularisation der Nervenfasern in den peritonealen Endometrioseläsionen wurde untersucht, um indirekt eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich bei den Nervenfasern in der Nähe der Endometrioseläsionen oder im Stroma von Endometrioseläsionen um neue oder präexistente Nervenfasern handelt.

An 40 peritonealen Proben mit Endometrioseläsionen wurde eine Dreifachfärbung mit

Antikörpern gegen Neurofilament, von-Willebrand-Faktor, einen Endothelmarker, und Smooth Muscle Actin durchgeführt. Neu entstandene unreife Gefäße weisen eine Endothelfärbung mit Antikörpern gegen von-Willebrand-Faktor, ohne einen äußeren Ring von glatten Muskelzellen, wie er bei reifen Gefäßen zu finden ist, auf (Matsuzaki et al. 2001, Nap et al. 2004).

Es zeigte sich, dass die Nerven in der Nähe oder im Stroma von Endometrioseläsionen ausschließlich von unreifen Gefäßen begleitet werden, die von-Willebrand-Faktor, nicht aber Smooth Muscle Actin exprimieren (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu werden in der Peripherie und im Peritoneum von Patientinnen aus der Kontrollgruppe die Nervenfasern ausschließlich von reifen Gefäßen mit Endothelfärbung und einem äußeren Ring von glatten Muskelzellen begleitet (Abbildung 6).

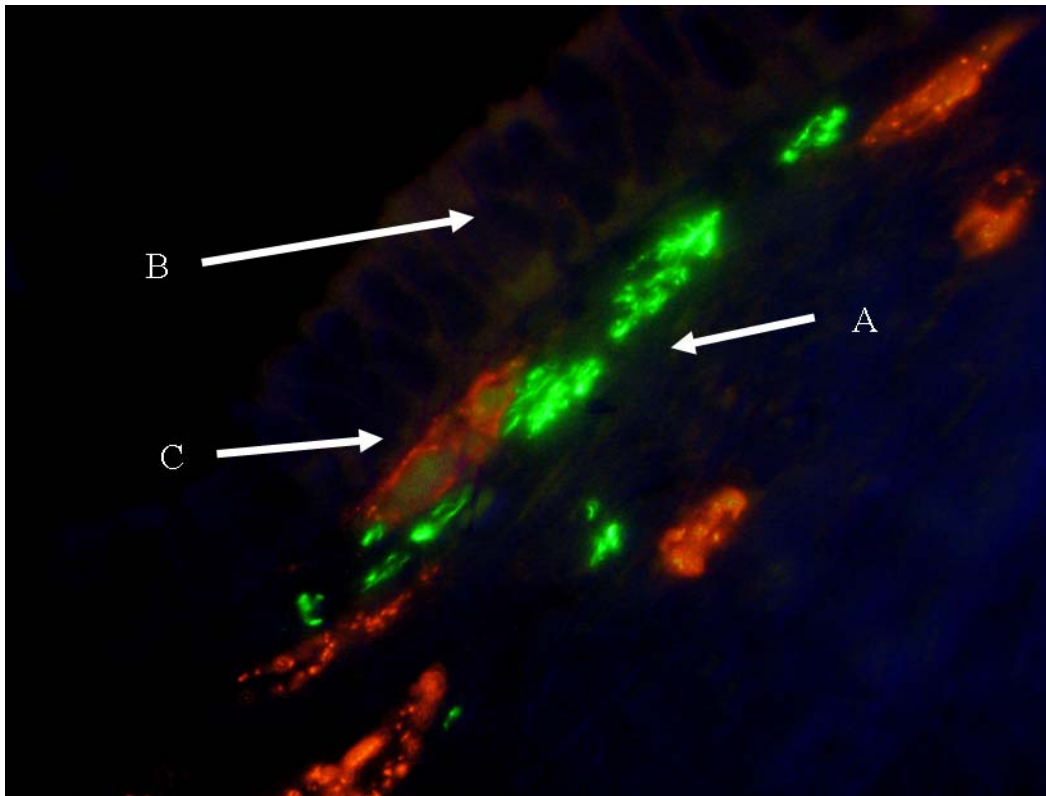


Abbildung 5. Dreifachfärbung gegen Neurofilament (grün), von-Willebrand-Faktor (rot) und Smooth Muscle Actin (blau). Nervenfasern (A) am Epithel (B) einer peritonealen Endometrioseläsion von unreifen Gefäßen (C) begleitet. Vergrößerung: 1000 x

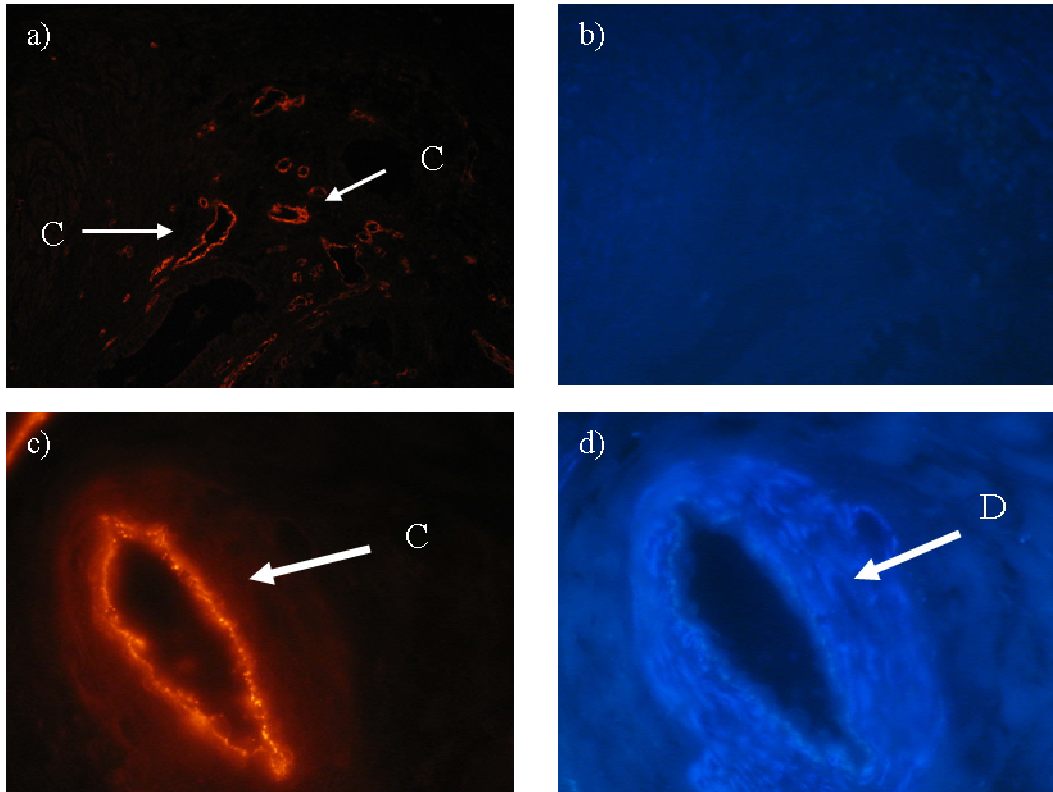


Abbildung 6. Dreifachfärbung gegen Neurofilament (grün), von-Willebrand-Faktor (rot) und Smooth Muscle Actin (blau). a, b) unreife Gefäße (C) im Stroma einer peritonealen Endometrioselesion ohne Smooth-Muscle-Actin-Färbung c, d) reifes Gefäß (C) mit Smooth-Muscle-Actin-Färbung (D) entfernt von der peritonealen Endometrioselesion. Vergrößerung: 400 x

4.3 Nervenwachstumsmarker in Nervenfasern von peritonealen Endometrioseläsionen – Growth-Associated-Protein-43-Färbung

Die Expression von Nervenwachstumsmarkern sollte untersucht werden, um zu untersuchen, ob die Nervenfasern in der Nähe von Endometrioseläsionen oder im Stroma von Endometrioseläsionen neu gewachsen sind.

Es wurden 20 peritoneale Proben mit Endometrioseläsionen immunhistochemisch mit Antikörpern gegen das Growth Associated Protein 43 untersucht. Das Growth Associated Protein 43 ist ein etablierter Marker für Nervenregeneration und -wachstum (Meiri et al. 1986, Verze et al. 2003).

In den Nervenfasern im Stroma und in der Nähe der peritonealen Endometrioseläsionen konnte eine mittlere bis starke Growth-Associated-Protein-43-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Nervenfasern in peritonealen Proben von 9 Patientinnen ohne Endometriose nur eine geringe Growth-Associated-Protein-43-Expression (Abbildung 7).

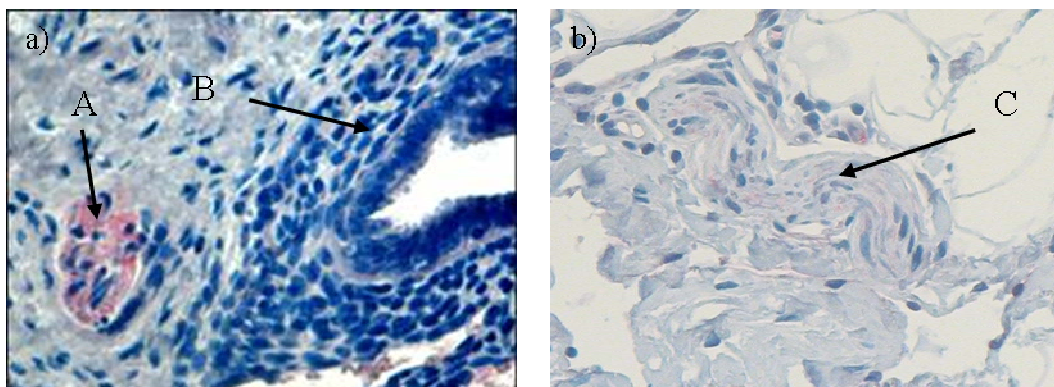


Abbildung 7. Färbung gegen Growth Associated Protein 43 (rot). a) Growth-Associated-Protein-43-positiver Nerv (A) im Stroma (B) einer peritonealen Endometrioseläsion b) gesundes Peritoneum mit Growth-Associated-Protein-43-negativem Nerv (C). Vergrößerung: 400 x

4.4 Nervenwachstumsfaktoren in peritonealen Endometrioseläsionen

Die Expression der Nervenwachstumsfaktoren Nerve Growth Factor und Neurotrophin 3 wurde untersucht, um potenzielle Botenstoffe für eine funktionelle Interaktion zwischen Endometriosezellen und Nervenzellen zu identifizieren. Dazu wurden zunächst immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschritten von Endometrioseläsionen durchgeführt. Zur Etablierung eines In-vitro-Interaktionsmodells zwischen Nervenzellen und Endometriosezellen wurde die Nervenwachstumsfaktorexpression auch in primären Endometriosezellkulturen untersucht.

4.4.1 Nerve-Growth-Factor-Färbung

23 peritoneale Gewebeprobe mit Endometrioselesionen wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Nerve Growth Factor, einem Nervenwachstumsfaktor (Levi-Montalcini et al. 1968), untersucht.

21 (91,3 %) der untersuchten Läsionen exprimierten den Nerve Growth Factor im Epithel, davon exprimierten 9 (39,1 %) den Nerve Growth Factor auch im Stroma der Läsion. Von den untersuchten Proben zeigten 6 (26,1 %) eine schwache, 4 (17,4 %) eine mittlere und 11 (47,8 %) eine starke Nerve-Growth-Factor-Expression (Abbildung 8). Es zeigte sich keine Zyklusabhängigkeit der Nerve-Growth-Factor-Expression.

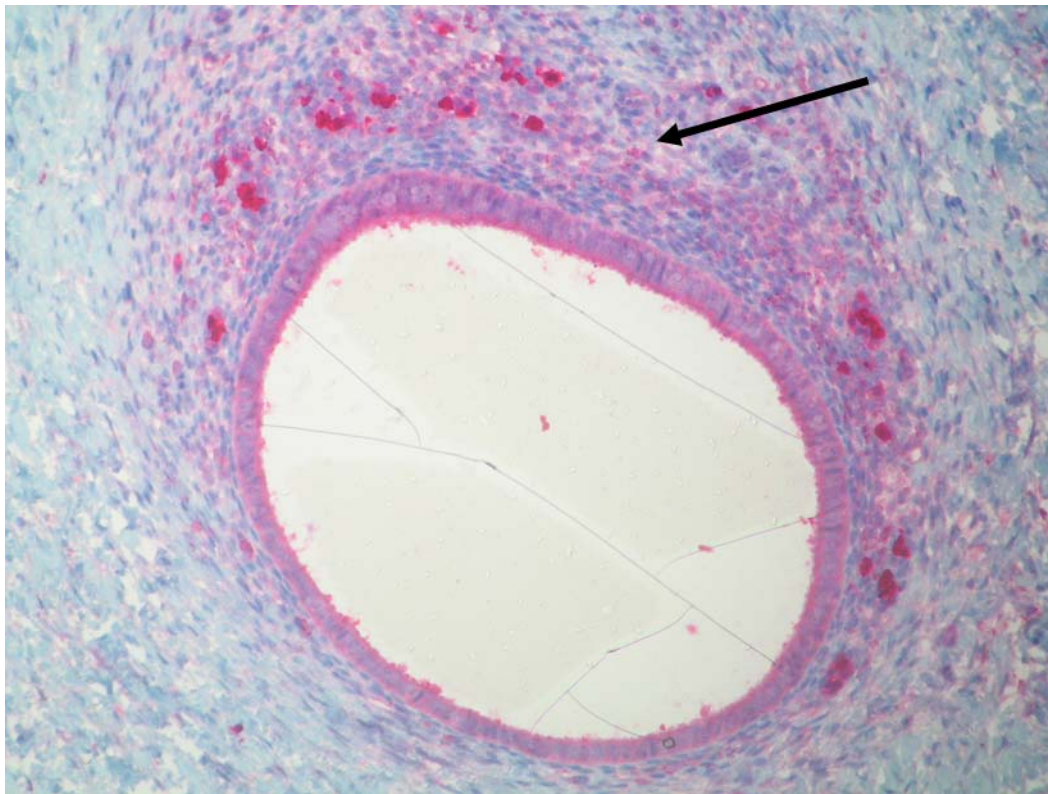


Abbildung 8. Färbung gegen Nerve Growth Factor (rot). Nerve-Growth-Factor-Expression im Stroma einer peritonealen Endometrioselesion. Vergrößerung: 400 x

4.4.2 Neurotrophin-3-Färbung

9 peritoneale Gewebeproben mit Endometrioseläsionen wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Neurotrophin 3, einem weiteren Nervenwachstumsfaktor (Maisonpierre et al. 1990) untersucht.

Alle 9 untersuchten Läsionen exprimierten Neurotrophin 3 im Epithel der Läsion (Abbildung 9). Dabei zeigten 8 (88,9 %) der untersuchten peritonealen Proben mit Endometrioseläsionen eine schwache Neurotrophin-3-Expression im Epithel. Eine Probe (11,1 %) wies eine mittlere Neurotrophin-3-Expression auf. Eine weitere Probe (11,1 %) wies zusätzlich eine schwache Neurotrophin-3-Expression im Stroma auf. Es zeigte sich keine Zyklusabhängigkeit der Neurotrophin-3-Expression.



Abbildung 9. Färbung gegen Neurotrophin 3 (rot). Neurotrophin-3-Expression im Stroma einer peritonealen Endometrioseläsion. Vergrößerung: 400 x

4.4.3 Nerve-Growth-Factor- und Vimentin- oder Cytokeratin-Doppelfärbung

Zellen von 5 primären Mischkulturen von Endometriosepatientinnen und Zellen der Endometriosezelllinie 12Z wurden mithilfe zweier Doppelfärbungen, einmal gegen Nerve Growth Factor und Cytokeratin, einen Epithelmarker (Prieto et al. 1996), und zum anderen gegen Nerve Growth Factor und Vimentin, einen Stromamarker (Mai et al. 1997), untersucht.

Sowohl die Epithelzellen als auch die Stromazellen aller untersuchten primären Endometriosezellmischkulturen und der Endometriosezelllinie 12Z exprimierten den Nerve Growth Factor (Abbildung 10).

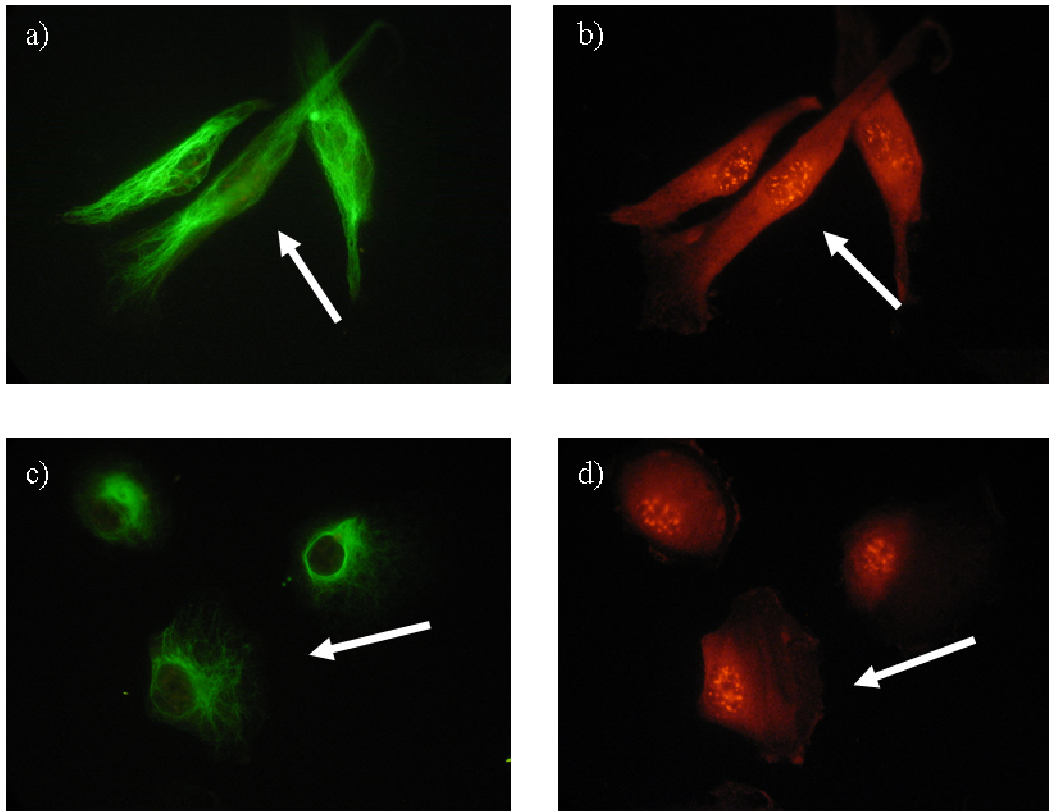


Abbildung 10. Doppelfärbung gegen Nerve Growth Factor (rot) und Vimentin (grün) und Cytokeratin (grün). a, b) Nerve-Growth-Factor-Expression (rot) in Vimentin-positiven (grün) Stromazellen und c, d) Nerve-Growth-Factor-Expression (rot) in Cytokeratin-positiven (grün) Epithelzellen aus primären Endometriosezellkulturen. Vergrößerung: 1000 x

4.4.4 Nerve Growth Factor Western Blot

Mithilfe eines weiteren Detektionssystems, der Western-Blot-Analyse, sollte der Nerve Growth Factor auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden.

Die für den pro Nerve Growth Factor spezifische Bande bei 27 Kilodalton (Delsite et al. 1999) konnte in 7 von 7 Zellysaten von primären Endometriosezellkulturen, in Zellysaten der Endometriosezelllinie 12Z und in 8 von 8 Endometriosegeweben nachgewiesen werden. Die spezifische Bande wurde auch in der Douglasflüssigkeit von 7 von 7 Endometriosepatientinnen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Douglasflüssigkeit einer Patientin ohne Endometriose eine viel schwächere Nerve-Growth-Factor-Expression.

Für den weiteren Versuchsaufbau wurden von primären Endometriosezellkulturen Konditionierte Medien gewonnen. In 5 von 5 untersuchten Konditionierten Versuchsmedien wurde eine für den prepro Nerve Growth Factor spezifische Bande bei 73 Kilodalton (Skaper et al. 2001, Yardley et al. 2000) nachgewiesen. (Abbildung 11)

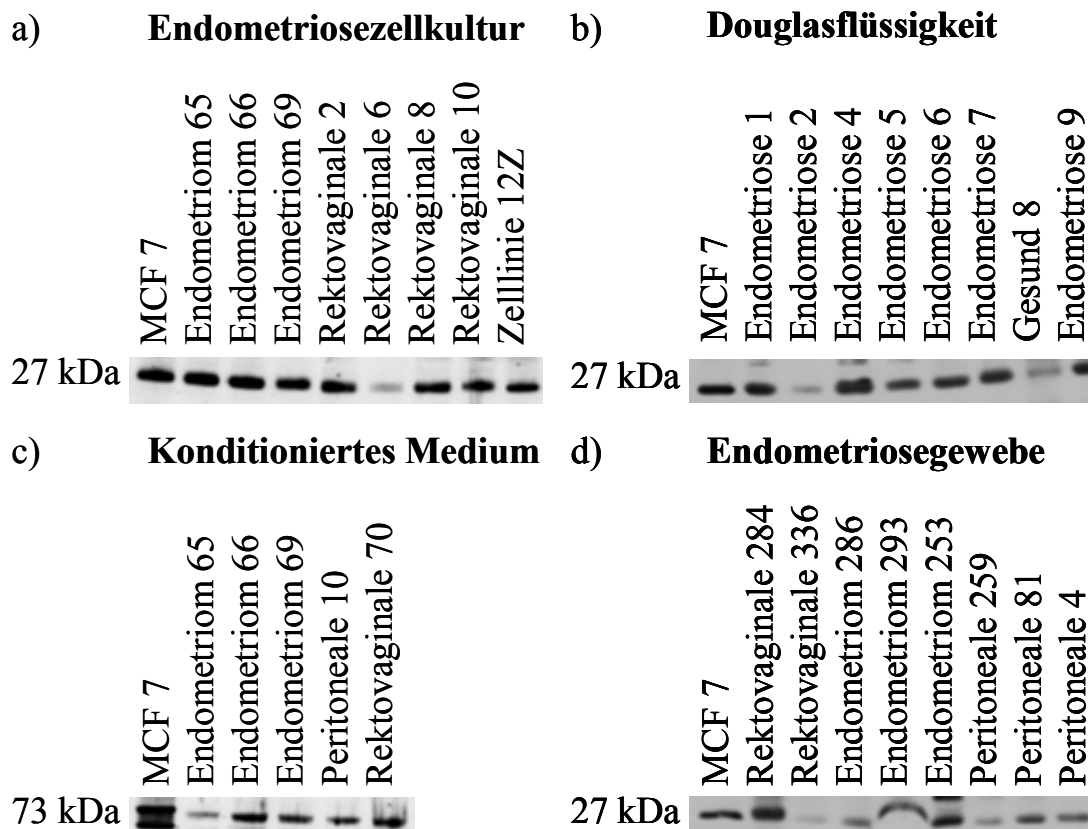


Abbildung 11. Nerve Growth Factor Western Blot von a) primären Endometriosezellkulturen b) Douglasflüssigkeit von Endometriosepatientinnen, c) konditionierten Medien von primären Endometriosezellkulturen und d) Endometriosegewebe

4.5 Wechselwirkungen zwischen Endometriose- und Nervenzellen

Um die Annahme zu überprüfen, dass der von den Endometrioseläsionen ausgeschüttete Nerve Growth Factor das gerichtete Wachstum der im Peritoneum vorliegenden Nerven zur Endometrioseläsion fördert, wurden die Wechselwirkungen zwischen Endometriose- und Ganglienzellen in vitro mithilfe des Neuronal Growth Assays untersucht.

4.5.1 Neuronal Growth Assay

Es wurden die Hinterwurzelganglien 10 Tage alter Hühnerembryonen in den Konditionierten Versuchsmedien von primären Zellkulturen von Endometriosepatientinnen 48 Stunden kultiviert. Außerdem wurden Hinterwurzelganglien in Versuchsmedium und in Versuchsmedium mit 100 ng/ml Nerve Growth Factor-2.5S (Sigma-Aldrich, München) kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Ganglien bezüglich ihrer Aussprossung mithilfe einer Skala von 0 bis 3 beurteilt. Wobei kein Aussprossen mit einer 0, das Auswachsen vereinzelter Nervenfasern mit einer 1, ein Zellsaum von mehr als einem Viertel des Gangliondurchmessers um das Ganglion mit einer 2 und ein Zellsaum von mehr als der Hälfte des Gangliondurchmessers um das Ganglion mit einer 3 bewertet wurde. Jedes Konditionierte Versuchsmedium wurde in drei unabhängigen Versuchen getestet und der Score im Durchschnitt bestimmt.

Dabei induzierten 5 der untersuchten 5 Konditionierten Versuchsmedien das Aussprossen der Ganglien, ähnlich dem Aussprossen der Ganglien, wie es bei Zugabe von exogenem Nerve Growth Factor hervorgerufen wird (Levi-Montalcini 1966, Levi-Montalcini et al. 1968, Lindsay et al. 1979) (Abbildung 12). Dabei wurde das Aussprossen der Ganglien unter Zugabe von exogenem Nerve Growth Factor im Durchschnitt mit 2,33 bewertet, ohne Zugabe von exogenem Nerve Growth Factor im Durchschnitt mit 0,75 und das Aussprossen der Ganglien im von Endometriosezellen Konditionierten Medium wurde im Durchschnitt mit 2,35 bewertet. (Tabelle 3)

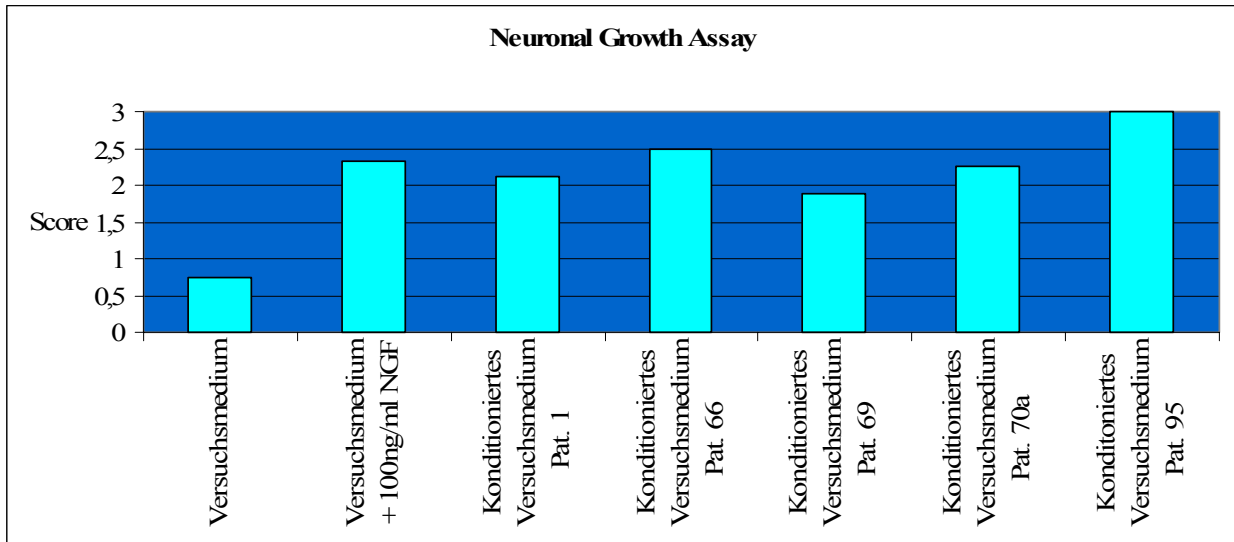


Tabelle 3. Neuronal Growth Assay Outcome deskriptiv. Score: 0 kein Aussprossen, 1 Aussprossen vereinzelter Nervenzellen, 2 Aussprossen um mehr als ein Viertel des Gangliondurchmessers, 3 Aussprossen um mehr als die Hälfte des Gangliondurchmessers

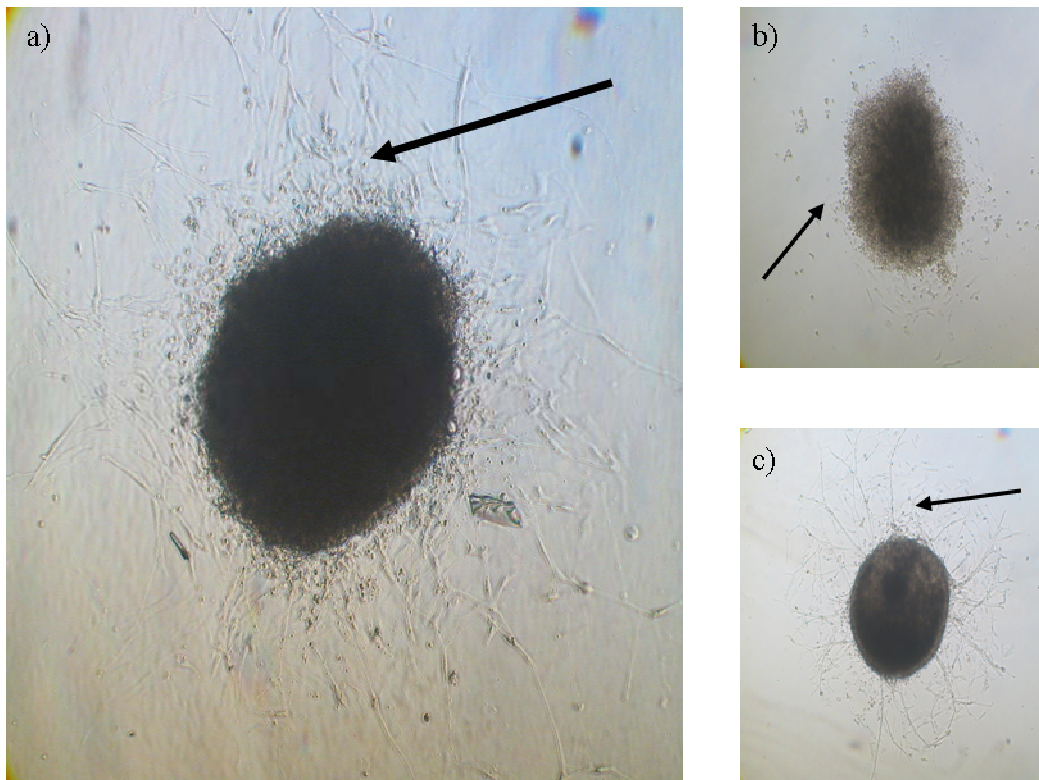


Abbildung 12. Neuronal Growth Assay zum Nachweis neurotropher Substanzen im von Endometriosezellen Konditionierten Medium. a) Aussprossen eines Hinterwurzelganglion im von Endometriosezellen Konditionierten Versuchsmedium, b) Negativkontrolle: Kein Aussprossen eines Hinterwurzelganglions im Versuchsmedium ohne Zusätze, c) Positivkontrolle: Aussprossen eines Hinterwurzelganglions im Versuchsmedium mit 100 ng/ml Nerve Growth Factor. Vergrößerung: 40 x

4.5.2 Neurofilamentfärbung der Hinterwurzelganglien

Um zu zeigen, dass in dem entstandenen Zellsaum um die Ganglien auch wirklich Nervenfasern ausgewachsen sind, wurden die Ganglien nach Beendigung des Versuches fixiert und mit Antikörpern gegen Neurofilament gefärbt.

Es zeigte sich bei allen untersuchten Ganglien ein dichtes Netz aus Nervenfasern, das bei Ganglien, die nur mit dem Versuchsmedium behandelt worden waren, nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 13).

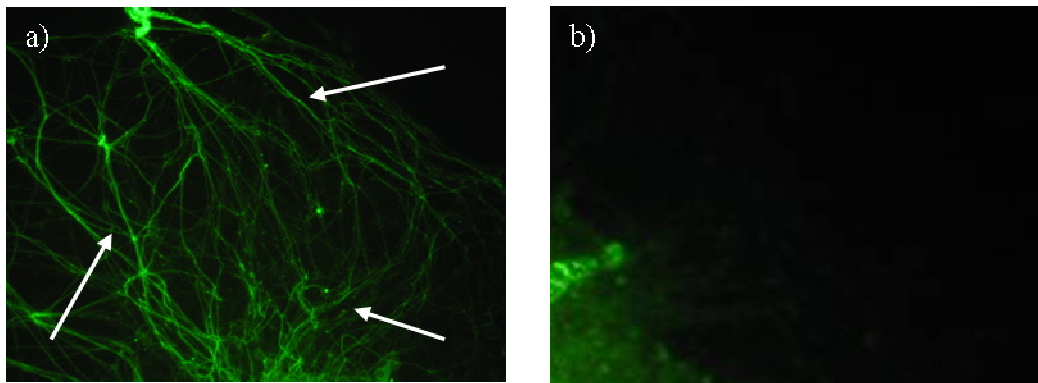


Abbildung 13. Färbung gegen Neurofilament (grün). a) Neurofilamentexpression eines Hinterwurzelganglions im von Endometriosezellen konditionierten Medium, b) Hinterwurzelganglion ohne Neurofilamentexpression im Versuchsmedium ohne Zusätze. Vergrößerung: 1000 x

5 Diskussion

5.1 Nachweis von sensiblen Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen

Es wurde gezeigt, dass in rektovaginalen, peritonealen und ovariellen Endometrioseläsionen Nerven gefunden werden können (Anaf et al. 2000, Tamburro et al. 2003, Tokushige et al. 2006). Dabei war die Nervenanzahl in rektovaginalen Endometrioseläsionen abhängig vom präoperativen Pain-Score (Anaf et al. 2000). In peritonealen Endometrioseläsionen war die Transforming-Growth-Factor- β 1-Expression der Nerven in den Endometrioseherden abhängig vom Schweregrad der Dysmenorrhoe der Patientinnen (Tamburro et al. 2003). Es wurde beschrieben, dass Nerven bei Frauen mit Schmerzen näher an der peritonealen Läsion zu sein scheinen (Tulandi et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals systematisch Nervenfasern im Stroma und in der unmittelbaren Nähe von peritonealen Endometrioseläsionen in einem großen Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass diese Nervenfasern Substanz P, ein Neuropeptid, das in sensiblen Nerven exprimiert wird (Henry 1982, Woolf et al. 1986), exprimieren, also sensible Anteile mit sich führen. Wie vorher vermutet wurde (Sulaiman et al. 2000, Sulaiman et al. 2001, Tokushige et al. 2006), führen die Endometriose-assoziierten Nervenfasern afferente Anteile, die Teil des sensiblen Nervensystems sind und Schmerzreize weiterleiten können.

Die gezeigte Lokalisation der sensiblen Nervenfasern im Stroma und in der Nähe der Läsionen bei 54 der 77 untersuchten Patientinnen lässt auf eine wichtige Rolle dieser Nervenfasern in der Ätiologie der Endometriose-assoziierten Schmerzen schließen. Es wurden bisher einige Schmerzmediatoren identifiziert, die in Endometrioseläsionen vermehrt ausgeschüttet werden (Dawood et al. 1984, Wu et al. 2007, Wu et al. 2003) und die Nervenfasern in den Endometrioseläsionen aktivieren können (Apfel 2000, Mantyh 2002, Schaible et al. 2002). Wenig ist jedoch über Neuromodulatoren bekannt, die möglicherweise die makroskopisch und histologisch gleichen Läsionen von symptomatischen und asymptomatischen Patientinnen (Whiteside et al. 2003) unterscheiden. Es wurde gezeigt, dass Nerven im Endometrioseperitoneum vermehrt Transforming Growth Factor β 1 exprimieren, ein Zytokin, das eine Hyperexzitabilität von sensiblen Nervenfasern bewirken kann. Die Expression konnte mit dem Schweregrad der Dysmenorrhoe korreliert werden (Tamburro et al. 2003). Es gibt außerdem erste Hinweise auf eine inadäquate, zu geringe Produktion von körpereigenem analgetisch wirkenden β -Endorphin bei Endometriosepatientinnen (Vercellini 1997).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass einige der Nerven nahe von Endometrioseläsionen von Stromazellen der Endometriose infiltriert zu sein scheinen. In rektovaginalen Endometrioseläsionen wurde ebenfalls eine perineurale Invasion von Stromazellen beschrieben (Anaf et al. 2000). Ein durch Nervenkompression und Infiltration hervorgerufener neuropathischer Schmerz, wie bei verschiedenen Tumorerkrankungen beschrieben (Rigor 2000), könnte auch Ursache der Endometriose-assoziierten Schmerzen sein. Ein statistischer Zusammenhang zwischen den vorgelegten Ergebnissen und der klinischen Symptomatik der Patientinnen konnte nicht erhoben werden, da alle Patientinnen symptomatisch waren und nicht alle Endometrioseherde der jeweiligen Patientin untersucht werden konnten. Daher sollten Arbeiten folgen, die auch asymptomatische Endometriosepatientinnen einschließen und alle Endometrioseläsionen der jeweiligen Patientin systematisch auf die Anwesenheit von Nervenfasern untersuchen.

5.2 Nachweis einer unreifen Vaskularisation von Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen

Die Pathogenese der Endometriose-assoziierten Schmerzen konnte bisher nicht geklärt werden (Whiteside et al. 2003). Wegweisend könnte es sein, zu klären, ob es sich bei den beschriebenen Nerven um präexistente oder neu entstandene Nervenfasern handelt, die einen pathogenetischen Einfluss auf die Endometriose-assoziierten Unterbauchschmerzen haben könnten. Um die in dieser Arbeit demonstrierten Nervenfasern in peritonealen Endometrioseläsionen bezüglich ihres Reifegrades weiter zu charakterisieren, wurde zunächst die Vaskularisation der Nervenfasern untersucht. Endometriosezellen fördern die Angiogenese durch das Ausschütten von Angiogenesefaktoren (Donnez et al. 1998, Healy et al. 1998, Matsuzaki et al. 1998, McLaren 2000, Taylor et al. 2002). Insbesondere aktive rote Läsionen haben einen hohen Anteil an unreifen Gefäßen (Matsuzaki et al. 2001, Nisolle et al. 1993). Neu entstandene unreife Gefäße weisen eine von-Willebrand-Faktor-positive Endothelfärbung, ohne einen äußeren Ring von glatten Muskelzellen, wie er bei reifen Gefäßen zu finden ist, auf (Matsuzaki et al. 2001, Nap et al. 2004).

Auch in dieser Arbeit konnten unreife Gefäße in den Endometrioseläsionen nachgewiesen werden. In allen untersuchten peritonealen Endometrioseläsionen wurden die Nervenfasern in der Nähe der Läsionen ausschließlich von unreifen Gefäßen begleitet. Nervenfasern, die von reifen Gefäßen begleitet wurden, konnten nur in Gefäßnervenbündeln entfernt von Endometrioseläsionen und in gesundem Peritoneum gefunden werden.

Untersuchungen an Tiermodellen haben gezeigt, dass die Reinnervation von Organtransplantaten

durch das Einwachsen von Nervenfasern entlang der neu entstehenden Blutgefäße erfolgt (Ferretti et al. 2003, Luts et al. 1998).

Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die untersuchten Nervenfasern der peritonealen Endometrioseläsionen mit ihren Gefäßen neu entstanden sind.

5.3 Nachweis von Nervenwachstumsmarkern in Nervenfasern von peritonealen Endometrioseläsionen

Die Kolokalisation der Nervenfasern in der Nähe von Endometrioseläsionen mit unreifen Gefäßen liefert Hinweise dafür, dass diese Nerven neueren Ursprungs sind. Um diese Theorie zu untermauern, wurde die Growth-Associated-Protein-43-Expression untersucht. Growth Associated Protein 43 ist ein etablierter Marker, der zwischen neu gewachsenen und ortsständigen peripheren Nerven unterscheidet (Meiri et al. 1986, Verze et al. 2003). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass das Growth Associated Protein 43 in den Endometriose-assoziierten Nervenfasern exprimiert wird. Somit konnte ein weiteres Indiz geliefert werden, dass sich diese Nerven neu formiert haben.

5.4 Nachweis von Nervenwachstumsfaktoren in peritonealen Endometrioseläsionen, Douglasflüssigkeit von Endometriosepatientinnen und in von Endometriosezellen Konditioniertem Medium

Um die in dieser Arbeit aufgestellte These, dass die Nervenfasern im Stroma und in der Nähe von peritonealen Endometrioseläsionen neu entstanden sind, zu bestätigen, wurde die Expression von Nervenwachstumsfaktoren als potenzielle Botenstoffe für eine funktionelle Interaktion zwischen Endometriosezellen und Nervenzellen untersucht.

Wie bei Anaf (Anaf et al. 2002) konnte immunhistochemisch die Expression von Nerve Growth Factor, einem Nervenwachstumsmarker (Levi-Montalcini et al. 1968), in peritonealen Endometrioseläsionen gezeigt werden. Zusätzlich konnte jedoch auch die Expression von Neurotrophin 3, einem weiteren Nervenwachstumsfaktor (Maisonpierre et al. 1990), demonstriert werden. Außerdem wurde die Expression von Nerve Growth Factor zusätzlich im Endometriosegewebe, in der Peritonealflüssigkeit von Endometriosepatientinnen, in primären Endometriosezellkulturen und in Konditionierten Versuchsmedien von primären Endometriosezellkulturen nachgewiesen.

Nerve Growth Factor ist nicht nur bekannt als Schmerzmediator, der Nerven sensibilisieren und aktivieren kann (Chuang et al. 2001, Pezet et al. 2006), sondern er kann auch das Auswachsen von Nerven stimulieren. In experimentellen Modellen wurde bestätigt, dass Nerve Growth Factor

und Neurotrophin 3 das Wachsen von Blutgefäßen und Nervenausprossen regulieren (Fu et al. 1997). Es gibt Hinweise, dass der Nerve Growth Factor eine große Rolle bei dem Einwachsen von Nerven in postoperative Adhäsionen spielen könnte (Sulaiman et al. 2000). In anderen Systemen wird der Prozess der Reinnervation von Organen regelmäßig beobachtet und ist häufig mit einer Neovaskularisation kombiniert (Ferretti et al. 2003, Sugitani et al. 1998).

Jedoch wurde bisher noch nicht die Frage nach einem Nervenwachstum, ausgelöst und beeinflusst durch die peritonealen Endometrioseherde, gestellt. Die in dieser Arbeit gezeigte Expression von Nervenwachstumsfaktoren, wie dem Nerve Growth Factor und Neurotrophin 3, in den Endometrioseläsionen lässt auf eine funktionelle Interaktion zwischen Endometrioseläsionen und Nervenfasern schließen.

5.5 Nachweis von neurotrophen Eigenschaften von Endometrioseläsionen

Im Rattenmodell wurden Hinweise dafür gefunden, dass sich bei einer chirurgisch induzierten Endometriose eine eigene autonome und sensible Innervation ausbildet (Berkley 2005, Berkley et al. 2004). Dort wurde eine Scheibe eines Uterushorns an die Mesenterialarterie transplantiert. Spezifische Marker für afferente und efferente Nervenfasern wurden benutzt, um die neu entstandenen Nerven, die nun das anwachsende ektope Endometrium versorgten, darzustellen. Es wurde angenommen, dass diese Innervation aus den peri- und paravaskulär verlaufenden Nervenfasern der einwachsenden Gefäße, die das ektope Endometrium vaskularisierten, resultierte (Barbieri 1988, Berkley et al. 2004). Dieses Phänomen wurde auch bei anderen Organtransplantationen an Tieren (Buvry et al. 1999, Kawaguchi et al. 1998, Mohanty et al. 1986) gezeigt.

Die in unserer Arbeit erhobenen Daten erweitern diese Untersuchungen an humanen Untersuchungsmaterialien. Hier konnte erstmalig in einem humanen Endometriosezellmodell, dem Neuronal Growth Assay, gezeigt werden, dass das von Endometriosezellen Konditionierte Versuchsmedium das Aussprossen von Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen induziert, also das Nervenzellwachstum fördert. Damit konnte gezeigt werden, dass auch Endometriosezellen in Kultur Nervenwachstumsfaktoren sezernieren. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass diese Nervenwachstumsfaktoren im Konditionierten Medium biologisch aktiv sind und Nervenwachstum fördern.

Es ist davon auszugehen, dass dieser Mechanismus auch bei der Implantation von Endometriosezellen im Peritoneum von Endometriosepatientinnen eine wichtige Rolle spielt und dass das Anwachsen der Läsionen nicht nur von einer Neoangiogenese, sondern auch von Einsprossen von Nervenfasern mit sensiblen Anteilen begleitet ist. Dies ist ein erster

pathogenetischer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen peritonealer Endometriose und Endometriose-assoziierten Schmerzen.

6 Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass sich in humanen peritonealen Endometrioseläsionen neu entstandene Nervenfasern mit sensiblen Anteilen befinden, die von unreifen Gefäßen begleitet werden und Nervenwachstumsmarker exprimieren (Mechsner et al. 2007). Es wurde weiterhin gezeigt, dass Nervenwachstumsfaktoren, die als Transmitter zwischen Endometrioseläsion und Nervenfasern fungieren können, in peritonealen Endometrioseläsionen exprimiert werden. Im Neuronal Growth Assay konnte bestätigt werden, dass Endometriosezellen das Nervenzellwachstum fördern. Diese Ergebnisse belegen, dass Endometriosezellen neurotrophe Eigenschaften, also einen stimulierenden Effekt auf das Nervenzellwachstum, besitzen. Es ist anzunehmen, dass diese neurotrophen Eigenschaften zur Pathogenese von Endometriose-assoziierten Unterbauchschmerzen beitragen. Das Neuronal Growth Assay kann die Basis für weitere funktionelle Interaktionsuntersuchungen sein, um die Ätiologie der Schmerzentstehung bei Endometriosepatientinnen besser zu verstehen.

7 Zusammenfassung

Zu den Leitsymptomen der Endometriose gehören Schmerzsymptome wie Dysmenorrhoe, Dyspareunie und chronische Unterbauchschmerzen. Die Frage nach dem Mechanismus der Schmerzentstehung ist bei dieser Erkrankung jedoch nach wie vor nicht vollständig zu beantworten. Ziel der Untersuchungen war es, die histomorphologischen Beziehungen zwischen peritonealen Endometrioseläsionen und den umliegenden Nervenfasern zu untersuchen. Zudem sollten diese Nervenfasern bezüglich ihrer Qualität charakterisiert werden. Um eine Aussage über den Reifegrad dieser Nervenfasern zu treffen, sollten die Vaskularisation und die Expression von Nervenwachstumsmarkern untersucht werden. Die Expression von Nervenwachstumsmarkern, als potenzielle Botenstoffe für eine funktionelle Interaktion zwischen Endometriosezellen und Nervenzellen, sollte zusätzlich im Endometriosegewebe und in Endometriosezellkulturen untersucht werden. Zudem war es Ziel der Untersuchungen, ein In-vitro-Modell zur Interaktionsanalyse zwischen Endometriose- und Nervenzellen zu etablieren.

106 peritoneale Endometrioseläsionen von 73 Patientinnen wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Neurofilament, einem Marker für Nervenfasern, Substanz P, einem Markermolekül für sensible Nerven, Nerve Growth Factor, einem Nervenwachstumsfaktor, Neurotrophin 3, einem weiteren Nervenwachstumsfaktor, und Growth Associated Protein 43, einem Nervenwachstumsmarker, untersucht. Zusätzlich wurde eine Dreifachfärbung gegen Neurofilament, von-Willebrand-Faktor und Smooth Muscle Actin durchgeführt. Primäre Endometriosezellkulturen wurden per Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Nerve Growth Factor gefärbt. Western-Blot-Analysen wurden durchgeführt, um die Anwesenheit von Nerve Growth Factor in primären Zellkulturen von Endometrioseläsionen, in der Douglasflüssigkeit von Endometriosepatientinnen, in Endometriosegewebe und den konditionierten Versuchsmedien von primären Endometriosezellkulturen nachzuweisen. Um die Wechselwirkungen zwischen Nerven und dem von Endometriosezellen produzierten Nerve Growth Factor zu untersuchen, wurden im Neuronal Growth Assay Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen in von Endometriosezellen konditioniertem Versuchsmedium kultiviert.

Bei 56 von 73 Patientinnen (76,7 %) konnten Nervenfasern mit Kontakt zur Endometrioseläsion (<1,5 mm) oder direkt im Stroma der Endometrioseläsion gezeigt werden. Alle untersuchten Schnitte wiesen Nervenfasern im Stroma von peritonealen Endometrioseläsionen mit Substanz P positiven Anteilen auf. Mithilfe der Dreifachfärbung zeigte sich, dass die Nervenfasern im Stroma der peritonealen Endometrioseläsionen ausschließlich von unreifen Gefäßen begleitet werden. Außerdem exprimieren diese Nervenfasern das Growth Associated Protein 43. Alle

untersuchten Endometrioseherde weisen eine mittlere bis starke Nerve-Growth-Factor-Expression und eine schwache bis mittlere Neurotrophin-3-Expression auf. Mithilfe der Western-Blot-Analyse konnte der Nerve Growth Factor in den primären Zellkulturen von Endometrioseläsionen, in der Douglasflüssigkeit von Endometriosepatientinnen, im Endometriosegewebe und in den konditionierten Versuchsmedien von primären Endometriosezellkulturen nachgewiesen werden. Im Neuronal Growth Assay induzierte das konditionierte Versuchsmedium das Aussprossen der Ganglien so, wie es auch durch die Zugabe von exogenem Nerve Growth Factor ausgelöst wird.

In dieser Untersuchung konnten Nervenfasern im Stroma und in der Nähe von peritonealen Endometrioseläsionen nachgewiesen werden. Außerdem konnte bewiesen werden, dass diese Nervenfasern sensible Anteile mit sich führen. Da diese Nervenfasern von unreifen Gefäßen begleitet werden und Nervenwachstumsmarker exprimieren, konnte gezeigt werden, dass diese Nervenfasern neu entstanden sind. In diesen Untersuchungen konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass nicht nur peritoneale Endometrioseläsionen, sondern auch primäre Endometriosezellkulturen den Nerve Growth Factor exprimieren und dass Hinterwurzelganglien von Hühnerembryonen in von Endometriosezellen konditionierten Versuchsmedien aussprossen. Diese Ergebnisse belegen, dass Endometriosezellen neurotrophe Eigenschaften, also einen stimulierenden Effekt auf das Nervenzellwachstum, besitzen. Es ist anzunehmen, dass diese neurotrophen Eigenschaften zur Pathogenese von Endometriose-assoziierten Unterbauchschmerzen beitragen. Das Neuronal Growth Assay kann nun Basis für weitere Interaktionsuntersuchungen sein, um die Ätiologie der Schmerzentstehung bei Endometriosepatientinnen besser zu verstehen.

8 Literaturverzeichnis

- Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* 1997;67:817-21.
- Relationship between stage, site and morphological characteristics of pelvic endometriosis and pain. *Hum Reprod* 2001;16:2668-71.
- Allen C, Hopewell S, Prentice A Non-steroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;CD004753.
- Anaf V, Simon P, El Nakadi I, et al. Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules. *Hum Reprod* 2000;15:1744-50.
- Anaf V, Simon P, El Nakadi I, et al. Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Hum Reprod* 2002;17:1895-900.
- Apfel SC Neurotrophic factors and pain. *Clin J Pain* 2000;16:S7-11.
- Bahtiyar MO, Seli E, Oral E, et al. Follicular fluid of women with endometriosis stimulates the proliferation of endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 1998;13:3492-5.
- Balasz J, Creus M, Fabregues F, et al. Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study. *Hum Reprod* 1996;11:387-91.
- Barbieri RL New therapy for endometriosis. *N Engl J Med* 1988;318:512-4.
- Barbieri RL, Ryan KJ Danazol: endocrine pharmacology and therapeutic applications. *Am J Obstet Gynecol* 1981;141:453-63.
- Barlow DH, Glynn CJ Endometriosis and pelvic pain. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1993;7:775-89.
- Berkley KJ A life of pelvic pain. *Physiol Behav* 2005;86:272-80.
- Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, et al. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11094-8.
- Bryce GJ, Ribchester RR Culture of isolated embryonic chick dorsal root ganglia at an air-liquid interface: a simple method for studying the mechanism and control of neurite outgrowth. *J Neurosci Methods* 1993;48:89-97.
- Buvry A, Yang YR, Tavakoli R, et al. Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and neuroendocrine cells after lung transplantation in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:1268-73.
- Chapron C, Barakat H, Fritel X, et al. Presurgical diagnosis of posterior deep infiltrating endometriosis based on a standardized questionnaire. *Hum Reprod* 2005;20:507-13.
- Chapron C, Fauconnier A, Dubuisson JB, et al. Deep infiltrating endometriosis: relation between severity of dysmenorrhoea and extent of disease. *Hum Reprod* 2003;18:760-6.
- Chin J, Liu RY, Cleary LJ, et al. TGF-beta1-induced long-term changes in neuronal excitability in alysia sensory neurons depend on MAPK. *J Neurophysiol* 2006;95:3286-90.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 2001;411:957-62.
- Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, et al. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance. *Fertil Steril* 1990;53:978-83.
- Dawood MY, Khan-Dawood FS, Wilson L, Jr. Peritoneal fluid prostaglandins and prostanoids in women with endometriosis, chronic pelvic inflammatory disease, and pelvic pain. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148:391-5.
- Delsite R, Djakiew D Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* 1999;41:39-48.

- Dolle L, El Yazidi-Belkoura I, Adriaenssens E, et al. Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:5592-601.
- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod* 1998;13:1686-90.
- Ebert AD. *Endometriose Ein Wegweiser für die Praxis*. 2. Auflage. Berlin: Walter de Gruyter Verlag, 2006.
- Evers JL, Dunselman GA, Land JA, et al. Is there a solution for recurrent endometriosis? *Br J Clin Pract Suppl* 1991;72:45-50; discussion 1-3.
- Fauconnier A, Chapron C Endometriosis and pelvic pain: epidemiological evidence of the relationship and implications. *Hum Reprod Update* 2005;11:595-606.
- Fauconnier A, Chapron C, Dubuisson JB, et al. Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. *Fertil Steril* 2002;78:719-26.
- Fedele L, Bianchi S, Arcaini L, et al. GnRH agonists in the treatment of endometriosis. *Acta Eur Fertil* 1988;19:5-12.
- Fedele L, Bianchi S, Bocciolone L, et al. Pain symptoms associated with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1992;79:767-9.
- Fedele L, Parazzini F, Bianchi S, et al. Stage and localization of pelvic endometriosis and pain. *Fertil Steril* 1990;53:155-8.
- Ferretti A, Boschi E, Stefani A, et al. Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant. *Life Sci* 2003;73:1985-94.
- Forman RG, Robinson JN, Mehta Z, et al. Patient history as a simple predictor of pelvic pathology in subfertile women. *Hum Reprod* 1993;8:53-5.
- Fu SY, Gordon T The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997;14:67-116.
- Giudice LC, Kao LC Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789-99.
- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* 1984;64:151-4.
- Hanna MH, Elliott KM, Stuart-Taylor ME, et al. Comparative study of analgesic efficacy and morphine-sparing effect of intramuscular dexketoprofen trometamol with ketoprofen or placebo after major orthopaedic surgery. *Br J Clin Pharmacol* 2003;55:126-33.
- Healy DL, Rogers PA, Hii L, et al. Angiogenesis: a new theory for endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998;4:736-40.
- Henry JL Relation of substance P to pain transmission: neurophysiological evidence. *Ciba Found Symp* 1982;206-24.
- Kawaguchi AT, Shirai M, Yamano M, et al. Afferent reinnervation after lung transplantation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:341-8.
- Keckstein J [Surgical therapy of endometriosis]. *Wien Med Wochenschr* 1999;149:366-71.
- Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20:2698-704.
- Kistner RW Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol* 1979;22:101-19.
- Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998;4:741-51.
- Koninckx PR, Meuleman C, Oosterlynck D, et al. Diagnosis of deep endometriosis by clinical examination during menstruation and plasma CA-125 concentration. *Fertil Steril* 1996;65:280-7.
- Levi-Montalcini R The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lect* 1966;60:217-59.
- Levi-Montalcini R, Angeletti PU Nerve growth factor. *Physiol Rev* 1968;48:534-69.
- Levi-Montalcini R, Caramia F, Luse SA, et al. In vitro effects of the nerve growth factor on the fine structure of the sensory nerve cells. *Brain Res* 1968;8:347-62.

- Leyendecker G, Kunz G, Noe M, et al. Endometriosis: a dysfunction and disease of the archimetra. *Hum Reprod Update* 1998;4:752-62.
- Lindsay RM, Tarbit J Developmentally regulated induction of neurite outgrowth from immature chick sensory neurons (DRG) by homogenates of avian or mammalian heart, liver and brain. *Neurosci Lett* 1979;12:195-200.
- Luts L, Sundler F Autotransplantation of rat parathyroid glands: a study on morphological changes. *Transplantation* 1998;66:446-53.
- Mahmood TA, Templeton A Prevalence and genesis of endometriosis. *Hum Reprod* 1991;6:544-9.
- Mai KT, Yazdi HM, Perkins DG, et al. Pathogenetic role of the stromal cells in endometriosis and adenomyosis. *Histopathology* 1997;30:430-42.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, et al. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1990;247:1446-51.
- Mantyh PW Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry* 2002;63 Suppl 11:6-10.
- Marjoribanks J, Proctor ML, Farquhar C Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;CD001751.
- Maruo T, Laoag-Fernandez JB, Pakarinen P, et al. Effects of the levonorgestrel-releasing intrauterine system on proliferation and apoptosis in the endometrium. *Hum Reprod* 2001;16:2103-8.
- Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, et al. Angiogenesis in endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 1998;46:111-5.
- Matsuzaki S, Canis M, Murakami T, et al. Immunohistochemical analysis of the role of angiogenic status in the vasculature of peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 2001;76:712-6.
- McLaren J Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* 2000;6:45-55.
- Mechsner S, Bartley J, Loddenkemper C, et al. Oxytocin receptor expression in smooth muscle cells of peritoneal endometriotic lesions and ovarian endometriotic cysts. *Fertil Steril* 2005;83 Suppl 1:1220-31.
- Mechsner S, Schwarz J, Thode J, 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;
- Meiri KF, Pfenninger KH, Willard MB Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3537-41.
- Meyer R Über den Stand der Frage der Adenomyositis und Adenome im allgemeinen und insbesondere über Adenomyositis seroepithelialis und Adenomyometritis sarcomatosa. *ZBL. Gynäkologie* 1919;745-50.
- Mohanty PK, Thames MD, Capehart JR, et al. Afferent reinnervation of the autotransplanted heart in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:414-8.
- Moore J, Copley S, Morris J, et al. A systematic review of the accuracy of ultrasound in the diagnosis of endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;20:630-4.
- Moore J, Kennedy S, Prentice A Modern combined oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;CD001019.
- Muzii L, Marana R, Pedulla S, et al. Correlation between endometriosis-associated dysmenorrhoea and the presence of typical or atypical lesions. *Fertil Steril* 1997;68:19-22.
- Nap AW, Griffioen AW, Dunselman GA, et al. Antiangiogenesis therapy for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1089-95.

- Nisolle M, Casanas-Roux F, Anaf V, et al. Morphometric study of the stromal vascularization in peritoneal endometriosis. *Fertil Steril* 1993;59:681-4.
- Ohtake H, Katabuchi H, Matsuura K, et al. A novel in vitro experimental model for ovarian endometriosis: the three-dimensional culture of human ovarian surface epithelial cells in collagen gels. *Fertil Steril* 1999;71:50-5.
- Pezet S, McMahon SB Neurotrophins: Mediators and Modulators of Pain. *Annu Rev Neurosci* 2006;
- Porpora MG, Koninckx PR, Piazze J, et al. Correlation between endometriosis and pelvic pain. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1999;6:429-34.
- Prieto VG, Lugo J, McNutt NS Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffin-embedded cutaneous lesions. *J Cutan Pathol* 1996;23:234-41.
- Rawson JM Prevalence of endometriosis in asymptomatic women. *J Reprod Med* 1991;36:513-5.
- Rigor BM, Sr. Pelvic cancer pain. *J Surg Oncol* 2000;75:280-300.
- Rochat A, Omlin FX, Droz B Substrate-dependent migration of myelin-associated glycoprotein immunoreactive cells in cultured explants of dorsal root ganglia from chick embryos. *Dev Neurosci* 1988;10:236-44.
- Sampson JA Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927;422-9.
- Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:343-54.
- Schroder J, Lohnert M, Doniec JM, et al. Endoluminal ultrasound diagnosis and operative management of rectal endometriosis. *Dis Colon Rectum* 1997;40:614-7.
- Shah A, Fischer C, Knapp CF, et al. Quantitation of neurite growth parameters in explant cultures using a new image processing program. *J Neurosci Methods* 2004;136:123-31.
- Skaper SD, Pollock M, Facci L Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;97:177-85.
- Sugitani A, Reynolds JC, Tsuboi M, et al. Extrinsic intestinal reinnervation after canine small bowel autotransplantation. *Surgery* 1998;123:25-35.
- Sulaiman H, Gabella G, Davis C, et al. Growth of nerve fibres into murine peritoneal adhesions. *J Pathol* 2000;192:396-403.
- Sulaiman H, Gabella G, Davis MC, et al. Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Ann Surg* 2001;234:256-61.
- Szendei G, Hernadi Z, Devenyi N, et al. Is there any correlation between stages of endometriosis and severity of chronic pelvic pain? Possibilities of treatment. *Gynecol Endocrinol* 2005;21:93-100.
- Tamburro S, Canis M, Albuissou E, et al. Expression of transforming growth factor beta1 in nerve fibers is related to dysmenorrhea and laparoscopic appearance of endometriotic implants. *Fertil Steril* 2003;80:1131-6.
- Taylor RN, Lebovic DI, Mueller MD Angiogenic factors in endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;955:89-100; discussion 18, 396-406.
- Thode J, Mechsner S, Halis G, et al. Medikamentös-endokrine Behandlungsoptionen der Endometriose Sexualsteroidrezeptoren als Target nutzen. *gynäkologie + geburtshilfe* 2006;28-34.
- Thomas EJ The relevance of asymptomatic endometriosis. *Hum Reprod* 1996;11 Suppl 3:103-9.
- Tokushige N, Markham R, Russell P, et al. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum Reprod* 2006;21:3001-7.
- Tonini G [Dysmenorrhea, endometriosis and premenstrual syndrome]. *Minerva Pediatr* 2002;54:525-38.

- Tulandi T, Felemban A, Chen MF Nerve fibers and histopathology of endometriosis-harboring peritoneum. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2001;8:95-8.
- Tuttles F, Keckstein J, Ulrich U, et al. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralbl Gynakol* 2005;127:275-81.
- Vercellini P Endometriosis: what a pain it is. *Semin Reprod Endocrinol* 1997;15:251-61.
- Vercellini P, Cortesi I, Crosignani PG Progestins for symptomatic endometriosis: a critical analysis of the evidence. *Fertil Steril* 1997;68:393-401.
- Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, et al. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertil Steril* 1996;65:299-304.
- Vercellini P, Vigano P, Somigliana E The role of the levonorgestrel-releasing intrauterine device in the management of symptomatic endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:359-65.
- Vernon MW, Beard JS, Graves K, et al. Classification of endometriotic implants by morphologic appearance and capacity to synthesize prostaglandin F. *Fertil Steril* 1986;46:801-6.
- Verze L, Viglietti-Panzica C, Maurizo S, et al. Distribution of GAP-43 nerve fibers in the skin of the adult human hand. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;272:467-73.
- Waller KG, Lindsay P, Curtis P, et al. The prevalence of endometriosis in women with infertile partners. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;48:135-9.
- Wheeler JM, Malinak LR Recurrent endometriosis: incidence, management, and prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146:247-53.
- Whiteside JL, Falcone T Endometriosis-related pelvic pain: what is the evidence? *Clin Obstet Gynecol* 2003;46:824-30.
- Woolf C, Wiesenfeld-Hallin Z Substance P and calcitonin gene-related peptide synergistically modulate the gain of the nociceptive flexor withdrawal reflex in the rat. *Neurosci Lett* 1986;66:226-30.
- Wu MH, Shoji Y, Chuang PC, et al. Endometriosis: disease pathophysiology and the role of prostaglandins. *Expert Rev Mol Med* 2007;9:1-20.
- Wu MY, Ho HN The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:285-96.
- Yardley G, Relf B, Lakshmanan J, et al. Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp Dermatol* 2000;9:283-9.

Curriculum Vitae

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

Erklärung

Ich, Jessica Schwarz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Neurotrophe Eigenschaften der Endometriose selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

04. März 2008

Jessica Schwarz

Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei:



Meinem Doktorvater Professor Dr. med. Dr. phil. Dr. h.c. Andreas D. Ebert, der mir dieses interessante Projekt ermöglicht hat, für das entgegengebrachte Vertrauen und die zahlreichen Möglichkeiten die Ergebnisse dieser Arbeit präsentieren zu dürfen.

Meiner Betreuerin Dr. med. Sylvia Mechsner für die Zusammenarbeit mit ihr, die eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit war. In zahlreichen Gesprächen und Diskussionen hat sie mir wertvolle Anregungen und fundierte Empfehlungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben. Ohne ihre konstruktive Kritik und weitreichende Unterstützung wäre mein Forschungsprojekt nicht zur Dissertation ausgereift.

Meinen Kolleginnen im Endometriosezentrum Dr. med. J. Bartley für ihre Unterstützung, Claudia Beutler für die praktische und tatkräftige Hilfe in vielen Versuchen und ganz besonders Dr. rer. med. Johanna Herbel für ihre Anregungen, Motivation und insbesondere für ihre Freundschaft.

Meinen Freunden Jessica Dienst, Oliver Döbler, Julia Hübner, Dr. med. Safi Khalil, Julia Rogmans und Jana Schlangen für eine tolle Studien- und Forschungszeit in der die nötigen Zerstreuungen nicht zu kurz kamen.

Meinen Eltern Salka und Rainer Schwarz für ihre unersetzliche Hilfe nicht nur bei Rechtschreibung und Statistik und noch viel wichtiger für ihre langjährige liebevolle Unterstützung in Wort und Tat, die mein Studium und nicht zuletzt diese Doktorarbeit überhaupt erst ermöglichten.

Meiner lieben Schwester Jenny Eva Schwarz für ihre immer offenen Arme, ihren Trost und ihren Optimismus.

Meinem Freund Dr. med. Peter Olschewski für seine Liebe und sein Lachen.