

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Analyse von Nervenfasern und Nervenwachstumsfaktoren
in der Adenomyose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Wagner

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abstrakt.....	IX
Abstract.....	XI
1 Einleitung.....	13
1.1 Adenomyose	13
1.2 Symptomatik der Adenomyose.....	15
1.3 Pathogenese der Adenomyose	15
1.4 Innervation des gesunden Uterus.....	16
1.5 Innervation der Adenomyose.....	17
1.6 Rolle der Neurotrophine und der Rezeptoren p75 und TrkA	18
1.7 Ziel dieser Arbeit	19
2 Materialien und Methoden.....	20
2.1 Labormaterialien.....	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Lösungen und Chemikalien	22
2.1.4 Puffer	23
2.1.5 Software	24
2.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	25
2.2.1 Patientinnen für die immunhistochemische Analyse.....	25
2.2.2 Patientinnen für das neuronale Wachstums-Assay	26
2.3 Materialgewinnung und Probenentnahme	29
2.3.1 Gewebeproben des Uterus.....	29
2.3.2 Entnahme der Peritonealflüssigkeit	29
2.4 Immunohistochemie	30
2.4.1 Immunhistochemische Färbungen.....	30
2.4.2 Immunhistochemische Auswertung	31
2.4.2.1 Auswertung der Nervenfaserdichte	32

2.4.2.2	Auswertung der Neurotrophin-Expression.....	32
2.5	Neuronales Wachstums-Assay	34
2.5.1	Lagerung und Bebrütung der Eier	34
2.5.2	Versuchsaufbau des NWA.....	34
2.5.3	Präparation der Hinterwurzelganglien.....	34
2.5.4	Auswertung der Neuritenaussprossung.....	35
2.5.5	Immunfluoreszenzanfärbung der Hinterwurzelganglien.....	35
2.6	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Uterine Neurotrophin-Expression	37
3.1.1	Nachweis der Neurotrophin-Expression	37
3.1.2	NGF- und NT-3-Expression im Endometrium und der Junktionalzone	37
3.1.3	NGF- und NT-3-Expression im Myometrium und in den AM- Herden.....	39
3.1.4	NGF- und NT-3-Expression im Vergleich zwischen Myometrium und Endometrium	40
3.1.5	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Neurotrophin- Expression im MM und der JZ.....	40
3.1.5.1	Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Zyklusphasen	41
3.1.5.2	Neurotrophin-Expression in Bezug auf den Hormonstatus...	41
3.1.5.3	Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Gravidität.....	42
3.1.5.4	Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Parität.....	43
3.1.5.5	Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Schmerz- anamnese	43
3.1.5.6	Neurotrophin-Expression bei Frauen mit Koinzidenz einer AM und EM.....	45
3.1.6	Nachweis von Nervenfasern im Uterus.....	46
3.1.7	Nervenfaserdichte des Stratum Functionale und Stratum Basale sowie der Junktionalzone	46
3.1.8	Nervenfaserdichte im Myometrium und inden Adenomyose- Herden.....	49
3.1.9	Fis-Score von Endometrium, Myometrium und Adenomyose- Herden.....	51
3.1.10	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Nervenfaserdichte im MM und der JZ	52
3.1.10.1	Nervenfaserdichte in Bezug auf die Zyklusphasen.....	52

3.1.10.2	Nervenfaserdichte in Bezug auf den Hormonstatus	53
3.1.10.3	Nervenfaserdichte in Bezug auf die Gravidität	53
3.1.10.4	Nervenfaserdichte in Bezug auf die Parität	54
3.1.10.5	Nervenfaserdichte in Bezug auf die Schmerzanamnese	55
3.1.10.6	Nervenfaserdichte bei Frauen mit AM und EM.....	57
3.1.11	Korrelation zwischen Neurotrophin-Expression und der NF-Dichte.....	57
3.2	Neurotrophe Eigenschaften der AM	59
3.2.1	Nervenfaseraussprossung beim NWA.....	59
3.2.2	Differenzierung der neu ausgesprossenen Nerven im NWA ..	60
4	Diskussion	62
5	Zusammenfassung.....	69
6	Literaturverzeichnis	70
7	Anhang.....	76
7.1	Eidesstaatliche Erklärung	76
7.2	Lebenslauf.....	77
7.3	Publikationsliste.....	79
7.4	Danksagung	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Uterus mit fokaler und diffuser AM.....	14
Abbildung 2: Das Modell des <i>tissue injury and repair</i> (TIAR).....	16
Abbildung 3: S100-Expression eines Uterus einer Patientin der AM-G	32
Abbildung 4: Immunhistochemische Darstellung des SB und SF in den Färbungen gegen NGF und NT-3.....	37
Abbildung 5: FIS NGF- und NT-3-exprimierender Zellen im MM und Endometrium der AM-G und Ko-G.....	40
Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung des SF, SB und der JZ der Ko-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75 ^{NTR} und TrkA.....	47
Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung von NF in der JZ in der Färbung gegen S100.....	47
Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung S100-positiver, myelinisierter Trunci im SB und der JZ.	48
Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung von NF im Myometrium in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75 ^{NTR} und TrkA	50
Abbildung 10: NF/mm ² des MM der AM-G und Ko-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75 ^{NTR} und TrkA.	50
Abbildung 11: AM-Herde in der S100-Färbung.....	51
Abbildung 12: NF/mm ² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5 und p75 ^{NTR} , unterteilt nach Parität.....	55
Abbildung 13: NF/mm ² in der JZ der Ko-G und AM-G in der S100-Färbung, unterteilt nach Schmerzpathogenese.....	56
Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung des MM einer Patientin der Ko-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, NGF, NT-3.....	58
Abbildung 15: Ganglien in verschiedenen Medien.....	59
Abbildung 16: Neuronaler-Wachstums-Score der Ganglien	60
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbungen der Ganglien.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Patientinnen für die IHC-Analyse.....	28
Tabelle 2: Übersicht der Patientinnen für das NWA.	29
Tabelle 3: Primärantikörper der IHC.	31
Tabelle 4: Sekundärantikörper der IHC & Streptavidin.	31
Tabelle 5: Primärantikörper des NWA.	36
Tabelle 6: Sekundärantikörper des NWA.....	36
Tabelle 7: Flächen-Intensitäts-Score NGF- und NT-3-exprimierender Zellen in den einzelnen Uterusschichten, unterteilt in Epithel- und Stromagewebe.	38
Tabelle 8: Flächen-Intensitäts-Score NGF- und NT-3-exprimierender Zellen im MM und den AM-Herden, unterteilt in Epithel- und Stromagewebe.....	39
Tabelle 9: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, unterteilt in Proliferations- und Sekretionsphase.....	41
Tabelle 10: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, unterteilt in Gruppen mit und ohne Hormoneinnahme.	42
Tabelle 11: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, unterteilt in Nulligravida und Gravida.	42
Tabelle 12: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, unterteilt in Nullipara und Multipara.....	43
Tabelle 13: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, unterteilt nach Schmerzvorkommen.....	44
Tabelle 14: FIS der einzelnen Uterusschichten der AM-G, unterteilt nach Dysmenorrhoe, Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe mit Unterbauchschmerzen.	44
Tabelle 15: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, unterteilt nach zusätzlichem Vorkommen von Endometriose in der AM-G	45
Tabelle 16: NF/mm ² im Endometrium und der JZ der Ko-G und AM-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75 ^{NTR} und TrkA.	46
Tabelle 17: NF/mm ² S100-positiver Trunci im SB und der JZ der AM-G und Ko-G, unterteilt nach Hormoneinnahme und Schmerzpathogenese.....	49

Tabelle 18: NF/mm ² im MM beider Gruppen und in den AM-Herden der AM-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75 ^{NTR} und TrkA	49
Tabelle 19: FIS der TrkA- und p75 ^{NTR} –Expression in MM, JZ, Endometrium und AM-Herden.....	51
Tabelle 20: NF/mm ² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, unterteilt nach Proliferations- und Sekretionsphase.....	52
Tabelle 21: NF/mm ² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, unterteilt nach Einnahme von Hormonen.....	53
Tabelle 22: NF/mm ² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, unterteilt nach der Gravidität.....	54
Tabelle 23: NF/mm ² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, unterteilt nach Schmerzpathogenese.....	55
Tabelle 24: NF/mm ² im MM und der JZ der AM-G, unterteilt nach Dysmenorrhoe, Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe mit Unterbauchschmerzen.	56
Tabelle 25: NF/mm ² im MM und in der JZ der Ko-G und der AM-G ohne Endometriose und mit Endometriose.....	57

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AM	Adenomyose
AM-G	Adenomyose-Gruppe
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Dapi	Diamino-Phenylindol-Dihydrochlorid
DM	Dysmenorrhoe
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Endometriose
FCS	fetales Kälberserum
FIS	Flächen-Intensitäts-Score
g	Gramm
GAP 43	<i>growth associated protein 43</i>
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HCL	Salzsäure
IgG	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
JZ	Junktionalzone
Ko-G	Kontrollgruppe
LAVH	laparoskopisch-assistierte vaginale Hysterektomie
M	Molare Masse
MM	Myometrium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mol	Einheit der Stoffmenge
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NF	Nervenfaser(n)
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NT-3	Neurotrophin 3
NWA	Neuronales Wachstums-Assay
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PF	Peritonealflüssigkeit
PGP9.5	<i>protein gene product 9.5</i>

p75 ^{NTR}	<i>low affinity-Rezeptor p75</i>
µm	Mikrometer
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SB	Stratum Basale
Sek.	Sekunden
SF	Stratum Functionale
S100	Kalzium-bindendes Protein
Tab.	Tabelle
TIAR	<i>tissue injury and repair</i>
Tris/Trizma	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrkA	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1</i>
TrkC	<i>neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3</i>
ÜN	über Nacht
US	Unterbauchschmerzen

Abstrakt

Einleitung

Aktuelle Publikationen beschreiben das Vorkommen von Nervenfasern (NF) speziell im Stratum Functionale des Endometriums ausschließlich von Frauen mit Endometriose und postulieren dies als eine Möglichkeit der nicht-invasiven Endometriose-Diagnostik.

Diese Arbeiten haben aber nicht die Möglichkeit einer Koinzidenz einer Adenomyose (AM) berücksichtigt, obwohl diese bei bis zu 90 % der Frauen vorliegt. Es wurden ausschließlich Frauen mit Endometriosis genitalis externa in die Untersuchungen einbezogen.

Daher war das Ziel dieser Arbeit in einer retrospektiven klinischen Studie mittels der Charakterisierung von NF sowie Nervenwachstumsfaktoren im Endometrium, Myometrium und in AM-Läsionen der Uteri von Frauen mit und ohne AM die neurotrophen Eigenschaften der Adenomyose darzustellen.

Methodik

Es wurden uterine Gewebeschnitte von Frauen mit histologisch gesicherter AM (n=42) und von gesunden Frauen (n=19) untersucht und mit Antikörpern gegen den Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF) und Neurotrophin-3 (NT-3) sowie den *high affinity*-Rezeptor TrkA (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1*), den *low affinity*-Rezeptor p75 (p75^{NTR}), *protein gene product 9.5* (PGP9.5, zur Darstellung intakter Nerven) und den neuronalen Marker S100 (zur Darstellung myelinisierter NF) gefärbt.

Zusätzlich wurden die neurotrophen Eigenschaften der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit und ohne AM in einem neuronalem Wachstums-Assay analysiert.

Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Endometrium sowohl von Frauen mit AM, als auch von gesunden Frauen sowie die AM-Läsionen von Frauen der AM-Gruppe nicht innerviert sind; nur vereinzelt ließen sich hier NF darstellen.

Es zeigten sich im Vergleich der AM-Gruppe und Kontrollgruppe weder im Myometrium noch im Endometrium signifikante Unterschiede in der Expression von NGF, NT-3, TrkA- und p75^{NTR}. Im Vergleich der Nervenfaserdichte beider Gruppen untereinander

gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch zeigte sich eine tendenziell verminderte S100-, PGP9.5-, TrkA- und p75^{NTR}-Expression im Myometrium der AM-Gruppe im Vergleich mit dem Myometrium der Frauen der Kontrollgruppe.

Im neuronalen Wachstums-Assay zeigten sich keine Unterschiede in der Aussprossung sensibler Ganglien nach Inkubation in der Peritonealflüssigkeit der Frauen mit und ohne AM.

Schlussfolgerung

Diese Ergebnisse deuten an, dass die endometriale und uterine Neurotrophineexpression und die endometriale Innervation in der Adenomyose im Vergleich zu gesunden Frauen nicht signifikant verändert ist. Jedoch zeigte sich in dieser Arbeit eine deutliche Tendenz zu einer eher verminderten uterinen Innervation bei Frauen mit Adenomyose.

Dies lässt das Vorkommen einer De- und Reinnervation in der Ätiologie des Krankheitsbildes vermuten, bei der Östrogen eine große Rolle spielt.

Abstract

Introduction

Recent publications describe the occurrence of nerve fibers (NF) specifically in the functional layer of the endometrium of women with endometriosis and postulate this as a way of non-invasive diagnosis of endometriosis. These studies have not considered the possibility of a coincidence of adenomyosis (AM), although it is present in up to 90% of women. There were only women with endometriosis genitalis externa included in these studies.

Therefore, the aim of this work was the investigation of neurotrophic properties of adenomyosis in a retrospective clinical study via the characterization of NF and nerve growth factors in the endometrium, myometrium and AM lesions in the uteri of women with and without AM.

Methods

Uterine tissue sections from women with histologically confirmed AM (n = 42) and from healthy women (n = 19) have been analyzed and stained with antibodies against nerve growth factor (NGF) and neurotrophin-3 (NT-3), *high affinity receptor* TrkA (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1), *low affinity receptor* p75 (p75^{NTR}), *protein gene product* 9.5 (PGP9.5, showing intact nerves) and the neuronal marker S100 (showing myelinated NF).

In addition, the neurotrophic properties of the peritoneal fluid of women with and without AM were analyzed in a neuronal growth assay.

Results

In this work it was shown that the endometrium of women with AM and healthy women and adenomyotic lesions of women in the adenomyosis group are not innervated, and only occasionally has there been a single NF.

In a comparison of the nerve fiber density of both groups, there were no significant differences, however, the women in the AM-group tend to have a decreased S100-, PGP9.5-, TrkA- and p75^{NTR}-expression in the MM when compared with the control-group.

In the comparison of the AM-group and control-group, neither in the MM nor in the endometrium were there significant differences in the expression of NGF, NT-3, TrkA and p75^{NTR}.

In the neuronal growth assay there has been no difference in the sprouting of sensitive ganglia after incubation in the peritoneal fluid of women with and without adenomyosis.

Conclusion

These results suggest that the endometrial and uterine neurotrophine expression and endometrial innervation are not altered in women with adenomyosis compared to healthy women, although there is the clear tendency to a reduced uterine innervation in women with adenomyosis.

This suggests the occurrence of de-and reinnervation in the etiology of this disease; estrogen may play a key role.

1 Einleitung

1.1 Adenomyose

Die Adenomyose ist eine gutartige gynäkologische Erkrankung, die sich durch das Vorkommen von endometrialen Drüsen- und Stromazellen innerhalb des Myometriums (MM) charakterisiert (1, 2). Definitionsgemäß liegt das ektope Gewebe mindestens 2,5 mm vom Endometrium entfernt und ist von hypertrophem und hyperplastischem MM umgeben (1, 3, 4).

Erstmals wurden Adenomyome 1860 von Carl von Rokitansky als Drüsengewebe im Myometrium beschrieben, ohne jedoch die Herkunft dieses Gewebes näher bezeichnen zu können (5). Im Laufe der Jahrzehnte beschäftigten sich viele Wissenschaftler mit den Adenomyomen und versuchten eine Einteilung nach Lokalisation, Aufbau und Ursprung zu formulieren. Den möglichen endometrialen Ursprung dieser Adenomyome stellte Cullen um 1920 dar (5). 1925 schuf Frankl erstmals den Begriff der Adenomyose als Definition von mukosaler Schleimhaut im Myometrium (5). Hiermit fand nun auch eine Trennung statt zwischen der Adenomyose und der Endometriose (EM), die 1927 von Sampson als Vorkommen endometrialen Gewebes außerhalb des Uterus beschrieben wurde. Eine genaue Definition der Adenomyose wurde 1972 von Bird vorgenommen (1, 5).

Mittlerweile wird die Adenomyose als eine Form der Endometriose angesehen (6). Diese wird in die Endometriosis genitalis interna (der Adenomyose), die Endometriosis genitalis externa [der Manifestation von endometrialem Gewebe in extrauterinen Organen des kleinen Beckens (z. B.: ovarielle Endometriose der Ovarien, peritoneale Endometriose des Peritoneums, rectovaginale Endometriose des Septum rectovaginale oder der Manifestation an der Blase, den Tuben, dem Ligamentum sacrouterinum, - latum, - rotundum, dem Rectum)] und die Endometriosis extragenitalis [der Manifestation der Endometriose in Organen außerhalb des kleinen Beckens (z. B.: Ureterenendometriose an den Ureteren, Endometriose in der Lunge)] unterteilt (6). Die Koinzidenz beider Erkrankungen ist hoch: Bis zu 90% der Frauen mit Endometriose weisen auch eine AM auf (7).

Die Adenomyose wird häufig in Multipara zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr entdeckt (1, 8), da bei Frauen im mittleren Lebensalter nach abgeschlossener

Familienplanung eher eine Hysterektomie durchgeführt wird, die zur Diagnosestellung führt. Oftmals haben Frauen mit AM andere Uteruserkrankungen wie Leiomyome, Endometriumpolypen, verschiedene Formen der Endometriose und teilweise Adenokarzinome (8-11).

Die Prävalenz wird in der Literatur mit einer Spanne von 0,5-70% der Frauen sehr unterschiedlich angegeben (12-14). Bis vor kurzem wurde die Diagnose Adenomyose histologisch gestellt und konnte somit nur nach einer Hysterektomie erfolgen. Die Indikation für solch einen Eingriff ist jedoch von Land zu Land unterschiedlich, wodurch sich die breite Prävalenz zum Teil erklären ließe. Ein anderer Grund kann durch unterschiedliche Maßstäbe in der Diagnosestellung gegeben sein; zudem ist die Diagnose abhängig vom jeweiligen Pathologen, der sie stellt. Mittlerweile gibt es mehrere Studien, die die Möglichkeit der Diagnosestellung einer AM mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) oder Transvaginaler Sonographie darstellen (2, 4, 15-17).

Die AM kann nach Lokalisation im Uterus unterschieden werden in eine superfizielle – und eine tiefe Form (18), wobei generell häufiger die hintere Uteruswand betroffen ist (4, 15). Nach der histologischen und morphologischen Erscheinung unter dem Mikroskop sowie im MRT kann eine Einteilung in die fokale AM, die auch Adenomyom genannt - und als umschriebene noduläre Struktur mit endometrialen Drüsen und Stroma definiert wird (4, 8, 9, 18, 19), und in die diffuse AM erfolgen, die sich dadurch auszeichnet, dass keine Adenomyome sichtbar sind, sondern lediglich eine diffus aufgelockerte und verbreiterte Grenzzone zwischen Endometrium und Myometrium (4, 9), (s. Abb. 1). Ebenso wie die Endometriose ist die AM Östrogen-abhängig (20, 21).

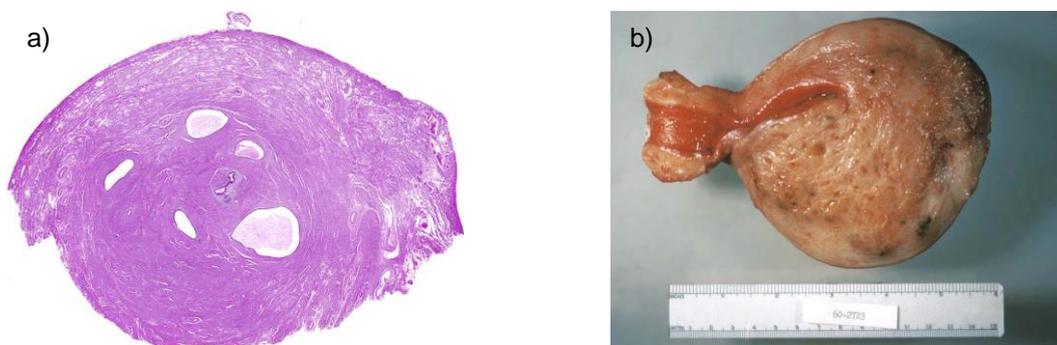


Abbildung 1: a) Histologische Sicht eines Uterus mit fokaler AM (Adenomyom), Vergrößerung $\times 25$; b) Makroskopische Ansicht eines Uterus mit diffuser AM in der vorderen Wand eines Uterus, Vergrößerung $\times 4$. (Bergeron, C. Pathology and physiopathology of adenomyosis. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology. 2006).

1.2 Symptomatik der Adenomyose

Bei etwa 35% der Frauen verläuft die Adenomyose asymptomatisch (22). Die am häufigsten beschriebenen Beschwerden sind ein diffus vergrößerter Uterus, sekundäre Dysmenorrhoe (DM), Hypermenorrhoe, Menorrhagie und Unterbauchschmerzen (US), (1, 8, 18, 22).

1.3 Pathogenese der Adenomyose

Die Pathogenese der Adenomyose ist noch immer nicht vollständig geklärt, jedoch gibt es viele verschiedene Erklärungsansätze.

Die am weitesten vertretene Theorie besagt, dass die Adenomyose durch eine Dislokation des basalen Endometriums in das Myometrium entsteht. Man nimmt an, dass ein uterines Trauma eine Zerstörung der intakten Grenze zwischen Endometrium und MM hervorruft (23). Dieses Trauma kann viele Ursachen haben. Die Gruppe Leyendecker et al. (23) hat eine *first and second step injury*-Theorie entwickelt, derzufolge nach einem primären Trauma des Uterus das sog. System des *tissue injury and repair* (TIAR) mit einer verlängerten parakrinen Östrogenausschüttung reagiert, welche durch eine Hyperperistaltik des Uterus zum sekundären Trauma desgleichen, der sog. Auto-Traumatisierung, führt (s. Abb. 2). Mikrotraumen (*first injury*) entstehen allgemein durch vermehrten mechanischen Stress des Uterus aufgrund einer vermehrten Uterusperistaltik, iatrogen (z. B. nach Hysterotomie) oder durch Schwangerschaften (7, 23). Die TIAR führt über mehrere Schritte zur Aktivierung der P450-Aromatase, die Östrogen produziert, welches über den Östrogenrezeptor ER-alpha zur Hyperperistaltik des Uterus führt (*second injury*). Dieser Prozess kann aufrechterhalten werden durch eine vermehrte Expression von P450-Aromatase und Östrogenrezeptoren im Adenomyose-Gewebe, welches den Effekt des Östrogens über parakrine Stimulation der Archimetra verstärkt (7, 8). Die Archimetra wird definiert als Endometrium und Archimyometrium (Stratum subvasculare des Myometrium) und bewirkt die uterine Peristaltik (7).

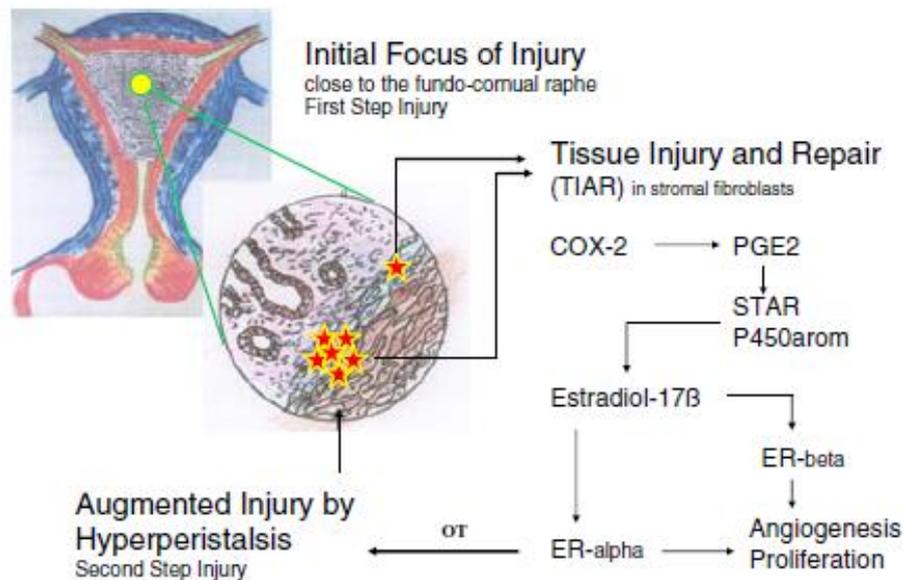


Abbildung 2: Das Modell des *tissue injury and repair* (TIAR). Die Verletzung des Archimyometrium (*first step injury*) führt über die TIAR zu einer gesteigerten Östrogensynthese, die eine Hyperperistaltik des Uterus bewirkt und durch die *second step injury* und hohe Östrogenlevel zu einer Aufrechterhaltung der Gewebeerstörung führt (Leyendecker, G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. Arch Gynecol Obstet. 2009).

1.4 Innervation des gesunden Uterus

Die Innervation eines gesunden Uterus unterliegt vielen Faktoren. Generell sind die meisten Nerven im Myometrium angeordnet, oftmals in Gefäßgebieten (24). Im Endometrium präsentieren sich die Nerven vor allem in der Grenzzone zwischen MM und Endometrium (24).

Während der Pubertät, der Schwangerschaft und nach der Entbindung finden zahlreiche Umbauvorgänge im Uterus statt, die auch die Nervendichte und -anordnung umfassen (25). Die Gruppe Haase et al. beschreibt eine Abnahme der Nervenfaserdichte in den Uteri von schwangeren Ratten, während sie postpartal eine Zunahme von Nervenfaserbündeln registrierten (26). Auch im menschlichen Uterus konnte bei schwangeren Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren eine Deinnervation gesehen werden. Die Gruppe Wikland et al. konnte in einer immunhistochemischen Analyse mit S100, einem Kalzium bindenden Protein, welches im Nukleus und im Zytoplasma von Schwannzellen vorkommt und als sensibler Marker für myelinisierte Nervenfasern dient (27), eine signifikant geringere Nervenfaserdichte im Myometrium schwangerer Frauen im Vergleich zu nicht schwangeren darstellen (28).

1.5 Innervation der Adenomyose

Viele Arbeitsgruppen haben sich bisher mit der Innervation der Endometriose beschäftigt, um die Pathogenese und Symptomatik des Krankheitsbildes besser erörtern zu können. Hierbei wurden lediglich Frauen mit Endometriosis genitalis externa in die Studien einbezogen.

Die Gruppe um Fraser beschreibt das Vorkommen von PGP9.5- Nervenfasern im Stratum Functionale (SF) des Endometriums ausschließlich bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Frauen und postuliert dies als eine Möglichkeit der nicht-invasiven Endometriose-Diagnostik (29, 30). PGP9.5 wird von Nervenfasern des peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert und stellt somit einen spezifischen Panmarker für intakte myelinisierte und unmyelinisierte NF dar (31). Ebenso stellte sich in der Publikation von Tokushige et al. ein vermehrtes Vorkommen von Neurofilament-positiven, myelinisierten – und PGP9.5-positiven Nervenfasern im MM und SB des Endometriums der Frauen mit Endometriose im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Ko-G) dar (29). In einer späteren Arbeit berichtet diese Gruppe von einer signifikant niedrigeren NF-Dichte im Endometrium und MM bei Frauen mit Endometriose nach einer Hormonbehandlung (32). Zudem wurde ein erhöhtes Vorkommen des *nerve growth factor* und dessen *low affinity*-Rezeptor p75 bei Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Frauen festgestellt, was sich erneut nach Hormongabe signifikant verringert hat (32). Eine mögliche Koinzidenz einer Adenomyose wurde allerdings in keiner der Studien berücksichtigt.

Die Innervation der Adenomyose wurde bisher von der Arbeitsgruppe Quinn et al. betrachtet, die in einer ihrer Arbeiten referiert, im Vergleich zu gesunden Frauen bei Frauen mit AM keine PGP9.5-positiven NF in der Junktionalzone (JZ) beobachtet zu haben und daher die Tendenz einer Deinnervation zu sehen (33).

Die Arbeitsgruppe Lin et al. hat hingegen die Beobachtung gemacht, dass sich im Stratum Functionale und Stratum Basale (SB) des Endometriums und im Myometrium von Frauen mit Adenomyose mit Schmerzen PGP9.5-positive NF befinden, im Vergleich zu Frauen mit AM ohne Schmerzen (20).

1.6 Rolle der Neurotrophine und der Rezeptoren p75 und TrkA

NGF und Neurotrophin-3 sind zwei Mitglieder aus der Gruppe der Neurotrophine. Neurotrophine sind Nervenwachstumsfaktoren, die als Zytokine über auto- und parakrine Sekretion die Erhaltung, das Wachstum, die Differenzierung sowie die Sensibilisierung vor allem von sympathischen und sensorischen Nervenfasern fördern (31, 34-37). Neurotrophine werden von sämtlichen Zellen exprimiert, die Ziel einer sympathischen und sensorischen Innervation sind; jedoch gibt es lokale Unterschiede. NGF wird von verschiedenen Zellen, wie z. B. Schwannzellen, Keratinozyten, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, T-Lymphozyten und Makrophagen, produziert (31, 38), während NT-3 außer der Expression in Nervenzellen auch in Muskel-, Leber- und Darmgewebe vorkommt (37). Im Rahmen der Endometrioseforschung konnte NGF im Stroma- und Epithelgewebe und NT-3 im Epithel von Endometrioseläsionen nachgewiesen werden (39, 40). NGF und NT-3 wirken beide über den p75^{NTR}- und NT-3 wirkt ebenso über den TrkC-Rezeptor (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3*), während NGF zusätzlich über den *high affinity*-Rezeptor TrkA wirkt. Letzterer wird vor allem von dünnen, sensorischen Nervenfasern, jedoch auch von nicht neuronalem Gewebe wie Muskelgewebe, B- und T-Lymphozyten, Mastzellen und Granulozyten exprimiert (39, 41-44). Der Rezeptor p75^{NTR} wird neben der Expression in sensorischen, nozizeptiven und nicht-nozizeptiven Nervenfasern auch von Muskel, Endothelzellen und B-Lymphozyten exprimiert (42). TrkC findet sich hingegen zusätzlich zum Vorkommen in zentralem und peripheren Nervengewebe in arteriellen Gefäßen, im Mesenchym des Urogenitaltrakts, der Nebenniere und Drüsenzellen (45). NGF und NT-3 spielen eine große Rolle für das physiologische und pathologische Schmerzempfinden. Es konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass Mäuse mit einer homozygoten Null-Mutation sowohl für NGF als auch für NT-3 einen Verlust an sensorischen und sympathischen Nervenzellen haben und hypoalgetisch sind (35, 46, 47), wohingegen eine Exposition von Ratten postnatal und auch im erwachsenen Alter mit NGF zu einer Hyperalgesie (48) oder eine Überexpression von NT-3 zum Anstieg sensorischer Nervenfasern führt (49). Neben der Bedeutung von NGF in der Schmerzpathogenese steigert es die Aktivität und das Überleben von Mast- und T-Zellen, stimuliert die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch Mastzellen

und vermittelt somit eine inflammatorische Immunantwort (35, 50). NT-3 wird darüber hinaus eine Rolle in der Angiogenese zugeschrieben (51). Aufgrund der Vielzahl von Funktionen, die den Neurotrophinen zukommen, gibt es eine Reihe von Impulsen, die deren Ausschüttung stimulieren. So wurde von der Arbeitsgruppe Smith et al. ein Anstieg des NGF-Levels im Uterus gesunder Ratten durch den Einfluss von Östrogen beschrieben (41). Barcena de Arellano et al. konnte in Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit Endometriose im Vergleich zu gesunden Frauen erhöhte NGF-Level feststellen (52). Dies deutet darauf hin, dass Endometriose-Läsionen die Sekretion von NGF induzieren, wodurch inflammatorische Faktoren und Schmerzmediatoren ausgeschüttet werden, die eine Aufrechterhaltung einer chronischen Inflammation ermöglichen und Schmerzprozesse stimulieren. Inwiefern auch in Frauen mit AM erhöhte NGF-Level festgestellt werden könnten soll in dieser Arbeit dargestellt werden.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die Expression der Neurotrophine NGF und NT-3 im Endometrium und Myometrium von Frauen mit Adenomyose zu charakterisieren und eine mögliche Korrelation zwischen der Neurotrophin-Expression und der Innervation des Uterusendometriums und –myometriums darzustellen. Hierzu dient zum einen eine Analyse der Expression von S100, PGP9.5, TrkA und p75^{NTR} zum NF-Nachweis mittels Immunhistochemie (IHC) und zum anderen die immunhistochemische Analyse der Expression von NT-3 und NGF im uterinen Gewebe von Frauen mit und ohne Adenomyose. Zusätzlich wurden in einem neuronalen Wachstums-Assay (NWA) die neurotrophischen Eigenschaften der Peritonealflüssigkeit (PF) von Frauen mit Adenomyose untersucht, indem die Nervenfaserausprossung von Hühnerembryonalen Hinterwurzelganglien in der PF analysiert wurde.

2 Materialien und Methoden

2.1 Labormaterialien

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovert 40 CFL Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Binokular Wild M8	Wild Heerbrugg, Schweiz
Brutmaschine Modell 3000	Jane Schütz GmbH, Deutschland
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Deutschland
Dampfgarkocher	Braun, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Deutschland
Gefrierschrank Ultra low, -80 °C	Sanyo, Deutschland
Gefrierschrank , -20 °C	Liebherr, Deutschland
Kamera Canon Power shot G5	Canon GmbH, Deutschland
Kühlschrank, 4 °C	Bosch, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte KMO 2 basic	Janke und Kunkel, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Deutschland
Mikrotom HM 400R	MICROM International GmbH, Deutschland
Mikrowellengerät NN-E205W	Panasonic, Deutschland
pH-Meter pH 300	Hanna Instruments, Deutschland
Pinzetten (spitz und gebogen)	A. Dumont & Fils, Schweiz
Pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Deutschland
Research Pipetten	Eppendorf, Deutschland

Saugmaschine	HLC Biotech, Deutschland
Schere BC 464	Aesculap AG, Deutschland
Tissue cool plate COP 20	Medite Medizintechnik, Deutschland
Trockenschrank	Ehret, Deutschland
Uhrmacherpinzette	Carl Roth GmbH, Deutschland
Ultracentrifuge Optima L-90 L	Heraeus, Deutschland
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, Deutschland
Wärmebad	Medax, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser Cover glass, 24 x 50mm	VWR International GmbH, Deutschland
Falcon Serologische Pipette, 5/10/25 ml	Becton Dickinson Labware, USA
Falcon Tubes, 15 ml	Becton Dickinson Labware, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Deutschland
Lab-Tek Chamber slide system	Nalge Nunc International, USA
Mikrotom-Skalpelle	Feather, Japan
Objekträger Super Frost Plus	Menzel, Deutschland
Petrischalen Nunclon Surface	Nunc, Dänemark
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Safe seal Reagiergefäße, 2 ml	Sarstedt, Deutschland
Vakzine Lohmann Spezifiziert Pathogen Frei Eier (Valo SPF)	Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland

2.1.3 Lösungen und Chemikalien

Chemikalien & Lösungen	Hersteller
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako Corporation, USA
Biotin Blocking System	Dako Corporation, USA
Citronensäure-Monohydrat	Merck KgaA, Deutschland
Dako Pen	Dako Corporation, USA
Dapi Fluoromount G	Southern Biotech, USA
DMEM/F-12	Invitrogen, Deutschland
Dulbecco's PBS 1x without Ca ²⁺ , Mg	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Ethanol 100 %	Merck, Deutschland
Ethanol 70 %	Merck, Deutschland
Ethanol 80 %	Merck, Deutschland
Ethanol 96 %	Merck, Deutschland
fetales Kälberserum	Biochrom, Deutschland
flüssiger Stickstoff	Linde, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 35 %	Hedinger, Deutschland
Fuchsin + Substrate Chromogen System	Dako Corporation, USA
HCl 37 %	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck KgaA, Deutschland
Kollagen IV (1:50)	Biochrom, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KgaA, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck KgaA, Deutschland

NGF 2,5S (0,1 ng/ml)	Sigma Aldrich, Deutschland
Paraformaldehydlösung	Merck, Deutschland
Paraplast Plus-Gewebeeinbettungsmedium	Leica Biosystems, USA
serum free protein block	Dako Corporation, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KgaA, Deutschland
Triton-X-100-Lösung	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
TRIZMA® Base	Sigma Chemical Co., USA
TRIZMA® Hydrochlorid	Sigma Chemical Co., USA
Xylol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland

2.1.4 Puffer

Puffer (l)	Zusammensetzung
Tris-Puffer (pH 7,4-7,6)	68,5 g Tris-HCl (10 mM) 8 g Tris-Base 87,8 g NaCl (150 mM) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und Einstellung auf pH 7,4 - 7,6 mit HCl/ NaOH
Citratpuffer (10 mM, pH 6)	18 ml Lösung A 82 ml Lösung B 900 ml Aqua dest.
Lösung A	21,01 g Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
Lösung B	29,41 g Natriumcitrat (C ₆ H ₅ O ₇ N ₃) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Triton-X-100-Lösung (0,2 %)	200 µl Triton X 100 ml PBS
Target-Retrieval-Lösung (pH 9.2)	21 g Tris Base 37 g EDTA 5 ml Tween 20 1000 ml Aqua dest.
Paraformaldehydlösung 4 %	4 g Paraformaldehyd mit PBS auf 100 ml auffüllen

2.1.5 Software

Software	Hersteller
Endnote X2	Thomson Research Software, USA
GraphPad Prism 5	Graph Pad Software, San Diego, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, USA
„Remote Capture“ Fotoprogramm	Canon GmbH, Deutschland
„Photo Scape“ Fotoprogramm	Photoscape, LLC, USA

2.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

2.2.1 Patientinnen für die immunhistochemische Analyse

Es wurden retrospektiv 61 Patientinnen ermittelt, die im Zeitraum von 1991 bis 2008 wegen symptomatischer Adenomyose oder anderer gynäkologischer Erkrankungen in der Hochschulambulanz der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, im Rahmen von verschiedenen operativen Eingriffen wie vaginaler Hysterektomie und der laparoskopisch-assistierten vaginalen Hysterektomie (LAVH) behandelt wurden.

Je nach Diagnose wurde das Patientinnenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt: 69 % der Patientinnen (n=42) befanden sich in der Adenomyose-Gruppe (AM-G) und 31 % der Patientinnen (n=19) in der Kontrollgruppe ohne AM oder EM. Von den 42 Patientinnen der AM-G hatten 90,5 % (n=38) eine fokale und 9,5 % (n=4) eine diffuse Adenomyose. Die Patientinnen waren im Mittel $44,3 \pm 4,5$ Jahre alt (34-57 Jahre Spannweite). Alle Frauen waren prämenopausal. Die jeweiligen Zyklusphasen wurden durch Angabe der letzten Menstruation errechnet und mittels histologischer Bewertung des Endometriums verifiziert. In der Adenomyose-Gruppe haben 64 % der Patientinnen mindestens zwei Monate vor der Operation keine Hormonpräparate eingenommen; davon waren 22,2 % in der Menstruations-, 55,6 % in der Proliferations- und 22,2 % in der Sekretionsphase. 36 % der Patientinnen standen unter Hormontherapie, wobei 10 Patientinnen orale Kontrazeptiva und 5 Patientinnen Gonadotropin-Releasing-Hormon-(GnRH)-Analoga einnahmen. Eine Einteilung nach Schwangerschaften ergab, dass 16,7 % keine, 21,4 % eine, 28,6 % zwei, 16,7 % drei, 7,1 % vier und 4,8 % fünf Schwangerschaften erlebt hatten. Von den 42 Frauen hatten 28,6 % keine, 35,6 % ein, 28,6 % zwei und 2,4 % vier Kinder. Von zwei Patientinnen lagen keine Angaben vor. Es wurde in der Auswertung der Schmerzanamnese ermittelt, dass 54,8 % der Patientinnen keine Schmerzen hatten, während 45,2 % über Schmerzen verschiedenster Art klagten. Hierbei wurden oftmals mehrere Symptome gleichzeitig genannt. 68,4 % der Frauen mit Schmerzen gaben Dysmenorrhoe und 63,2 % Unterbauchschmerzen (US) an. Dyspareunie, Dyschezie und Dysurie wurden vereinzelt angegeben. 19 % der Patientinnen der AM-G hatten zusätzlich zur diagnostizierten AM eine gesicherte Endometriose. Davon hatten 37,5 % eine rektovaginale Endometriose, 25 % eine ovarielle Endometriose, 25 % eine

extragenitale Peritonealendometriose und 12,5 % eine Ureterenendometriose (s. Tabelle 1).

Die Frauen der Kontrollgruppe waren im Mittel $42,7 \pm 4,2$ Jahre alt (34-49 Jahre Spannweite). Es nahmen 15,8 % der Frauen orale Kontrazeptiva ein. Von den restlichen 84,2 % der Frauen, die keine Hormonpräparate einnahmen, befanden sich 6,25 % in der Menstruations-, 56,25 % in der Proliferations- und 37,5 % in der Sekretionsphase. 26,3 % gaben keine, 15,8 % eine, 36,8 % zwei, 10,5 % drei, 5,3 % sechs und 5,3 % neun Schwangerschaften an. 47,4 % hatten keine, 26,3 % ein, 15,8 % zwei und 10,5 % drei Kinder. Auch in dieser Gruppe wurde eine Einteilung hinsichtlich der Schmerzanamnese vorgenommen, in der 42,1 % Schmerzen angaben. Von diesen Frauen nannten 37,5 % Unterbauchschmerzen und 75 % Dysmenorrhoe (Frauen mit beiden Symptomen wurden mehrfach aufgeführt). Dysurie wurde nur von einer und Dyschezie und Dyspareunie von keiner der Patientinnen angegeben (s. Tabelle 1).

2.2.2 Patientinnen für das neuronale Wachstums-Assay

Von 14 Patientinnen, die sich wegen symptomatischer gynäkologischer Beschwerden zwischen 2008 und 2010 in der gynäkologischen Hochschulambulanz der Charité - Universitätsmedizin Berlin untersuchen ließen, wurde im Rahmen von Laparoskopien prospektiv Peritonealflüssigkeit entnommen. Die Patientinnen waren zwischen 19 und 51 Jahre alt ($40,6 \pm 8,8$) und waren zum Zeitpunkt der Operation prämenopausal. Abermals wurden je nach Diagnose zwei Gruppen gebildet, die sich in die Gruppe der Frauen mit AM bzw. ohne AM oder EM, die als Kontrollgruppe diente, gliederten. Die Zyklusphase wurde erneut nach Angabe des letzten Menstruationstages errechnet, wobei diejenigen Frauen mit Hormoneinnahme ($n=2$) nicht berücksichtigt wurden. 85,7% der Patientinnen haben mindestens zwei Monate vor der Operation keine Hormone mehr eingenommen (s. Tabelle 2).

Die Patientinnen der Ko-G litten nicht an AM oder EM, sondern ließen sich aufgrund anderer gynäkologischer Beschwerden untersuchen, wie z. B. Uterus myomatosus oder Ovarialzysten. Patientinnen mit malignen Tumoren oder chronischen Entzündungen wurden ausgeschlossen. Die klinischen Patientendaten aller Patientinnen wurden in der Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin erhoben. Alle für diese Studie verwendeten Proben wurden

nach den Richtlinien der Ethikkommission der Universitätsmedizin - Charité Berlin erworben.

Tabelle 1: Übersicht der Patientinnen für die IHC-Analyse.

		Adenomyose-Gruppe	Kontrollgruppe
Anzahl		42	19
Alters-Mittelwert		45,8±4,9	42,7±4,2
Hormoneinnahme		15	3
	Orale Kontrazeptiva	10	3
	GnRH-A.	5	0
	keine	27	16
Zyklusphase	Menstruationsphase	6	1
	Proliferationsphase	15	9
	Sekretionsphase	6	6
Gravidität	0	7	5
	1	9	3
	2	12	7
	3	7	2
	4	3	0
	5	2	0
	6	0	1
	9	0	1
	unbekannt	2	0
Parität	0	12	9
	1	15	5
	2	12	3
	3	0	2
	4	1	0
	unbekannt	2	0
Schmerzen		19	8
	Unterbauchschmerzen	12 *	3 *
	Dysmenorrhoe	13 *	6 *
	Dysurie	1	1
	Dyspareunie	2	0
	Dyschezie	3	0
Keine Schmerzen		23	11

* Patientinnen mit US gaben oft gleichzeitig Dysmenorrhoe an und sind hier doppelt aufgeführt

Tabelle 2: Übersicht der Patientinnen für das NWA.

		Adenomyose-Gruppe	Kontrollgruppe
Anzahl		5	9
Alters-Mittelwert		40,2±12,6	41,1±4,9
Hormoneinnahme	Orale Kontrazeptiva	2	0
	keine	3	9
Zyklusphase	Menstruationsphase	0	1
	Proliferationsphase	1	4
	Sekretionsphase	0	3
	Nicht bekannt	4	1

2.3 Materialgewinnung und Probenentnahme

2.3.1 Gewebeproben des Uterus

Die operativ entnommenen Gewebeproben der Uteri aller Patientinnen wurden in 4%iger Formalinlösung für 12 Stunden fixiert und im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin - Charité, Campus Benjamin Franklin, in Paraffin eingebettet. Anschließend konnten von den Paraffinblöcken am Mikrotom 2-3 µm dünne Scheiben abgeschnitten und auf Objektträger aufgebracht werden, sodass sie mehrere Wochen bei 4 °C lagerbar und sofort für immunhistochemische Färbungen einsetzbar waren.

2.3.2 Entnahme der Peritonealflüssigkeit

Die PF wurde zu Beginn der Laparoskopie aus der Peritonealhöhle der Patientinnen entnommen und bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4 Immunohistochemie

2.4.1 Immunhistochemische Färbungen

Vor der immunhistochemischen Weiterverarbeitung wurden die auf die Objektträger aufgebrauchten Schnitte über Nacht (ÜN) bei 60 °C im Inkubator getrocknet. Anschließend wurden sie in Xylol entparaffiniert (2 x 10 min) und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 10 min 100 %iges Ethanol, anschließend je 5 min Ethanol 100 % / Ethanol 96 % / Ethanol 80 % / Ethanol 70 % und abschließend 10 min in Tris Puffer.

Um nun die Antigene zu demaskieren wurden die Schnitte je nach Antikörper (AK) entweder mit Citratpuffer (pH 6) oder mit Target-Retrieval-Lösung (pH 9,0-9,2) für 20 bis 40 min bei 95 °C im Dampfgarkocher gegart. Nach der Erhitzung wurden die Gewebeschnitte für 10 min auf Eis gekühlt und daraufhin in Tris Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden im darauf folgenden Schritt die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur (RT) mit fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert. Die Schnitte der Färbung gegen NGF wurden vorab mit dem Biotin-Blocking-System, diejenigen gegen NT-3 mit dem *serum free protein block* behandelt. Schnitte, die gegen TrkA gefärbt werden sollten, wurden mittels *Antibody diluent* geblockt. Hiernach wurde der jeweilige Primärantikörper (Anti-NT-3, Anti-NGF, Anti-S100, Anti-PGP9.5, Anti-p75^{NTR} und Anti-TrkA) auf die Präparate aufgetragen und bei RT für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert (s. Tabelle 3). Der AK zum Nachweis von S100 hatte lediglich eine Inkubationszeit von 30 min; der AK gegen TrkA musste 2 Stunden auf den Präparaten bleiben (s. Tabelle 3). Nach der Inkubation mit dem primären AK wurde der jeweilige Sekundärantikörper aufgetragen und bei RT für 40 min bis zu 1 Stunde auf den Schnitten belassen (s. Tabelle 4). Zuletzt wurde nun Streptavidin, ein tetrameres Protein, das sich an die Biotinstruktur des sekundären AK lagert, ebenfalls bei RT für 40 min auf die Präparate aufgebracht. Zwischen dem Auftragen der einzelnen AK wurden alle Schnitte gründlich mit Tris Puffer gespült, um das Verbleiben von Reagenzien zu vermeiden. Die Visualisierung der gebundenen AK erfolgte durch eine Inkubation mit dem Fuchsin-Substrate-Chromogen-System, welches nach 15 min mit Aqua dest. abgespült wurde. Im Anschluss fand für 20 bis 30 Sek. eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaunlösung statt. Abschließend wurden die Schnitte unter laufendem

Wasser gespült, getrocknet und mit erwärmter Glyceringelatine und Deckgläsern 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 Haut, Vorhaut und gesundem Darm eingesetzt.

Tabelle 3: Primärantikörper der IHC.

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
NT-3 (L-15): sc 13381	1:400	Polyklonaler Ziegen-Ak	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., USA
NGF (H-20): sc 548	1:100	Polyklonaler Kaninchen-Ak	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., USA
S 100	1:400	Polyklonaler Kaninchen-Ak	Dako Corporation, USA
p75 ^{NTR} (5H1)	1:100	Monoklonaler Maus-Ak	Santa-Cruz Biotechnology, Inc., USA
PGP9.5	1:600	Polyklonaler Kaninchen-Ak	Dako Corporation, USA
TrkA	1:200	Monoklonaler Kaninchen-Ak	Epitomics, USA

Tabelle 4: Sekundärantikörper der IHC & Streptavidin.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
Biotin-SP-Konjugiertes-Maus-Anti-Kaninchen-IgG	1:400	Maus-Ak	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Biotin-SP-Konjugiertes-Kaninchen-Anti-Ziege-IgG	1:400	Kaninchen-Ak	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Biotin-SP-Konjugiertes Kaninchen-Anti-Maus-IgG	1:400	Kaninchen-Ak	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Streptavidin-AP-Konjugat	1:400	Tetrameres Protein	Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, Illinois, USA

2.4.2 Immunhistochemische Auswertung

Die gefärbten IHC-Schnitte wurden unter dem Mikroskop analysiert. Hierzu wurden in verschiedenen Vergrößerungen (x2,5 / x10 / x200 und x400) die anatomischen Schichten des Uterus einzeln betrachtet: das Endometrium mit dem Stratum Functionale und - Basale, die Junktionalzone zwischen Endometrium und Myometrium, das MM sowie in der AM-G zusätzlich die AM-Herde und der unmittelbar angrenzende Bereich (s. Abb. 3).

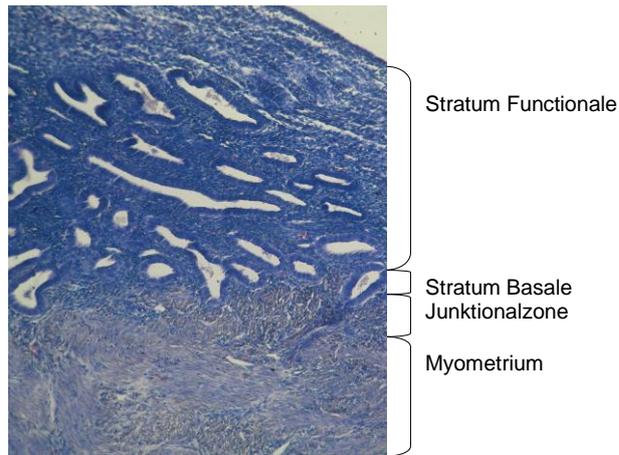


Abbildung 3: S100-Expression eines Uterus einer Patientin der AM-G, Vergrößerung x10.

2.4.2.1 Auswertung der Nervenfaserdichte

Für den Nervenfasernachweis mittels der immunhistochemischen Marker S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA wurde jeweils an zwei Stellen pro Schicht die Nervenfaserdichte in der 200fachen Vergrößerung ermittelt, die einer Fläche von 1 mm² entspricht. Für das Myometrium wurde die Nervenfaserdichte/ mm² mittels der sog. Hot-Spot-Methode analysiert, bei der für eine Fläche von 1 mm² (x200) die Stelle mit den meisten Nervenfasern ermittelt und ausgezählt wird (53).

2.4.2.2 Auswertung der Neurotrophin-Expression

Die Schnitte, die gegen die Neurotrophine NGF und NT-3 angefärbt waren sowie gegen die Neurotrophinrezeptoren TrkA und p75^{NTR}, wurden hinsichtlich der prozentualen Anfärbung der einzelnen Schichten bewertet. Zu diesem Zweck wurde in den einzelnen Schichten nochmals zwischen Epithel und Stroma unterschieden, jede Schicht wurde komplett bewertet und ein Mittelwert gebildet. Die Anfärbung der Zellen wurde prozentual von 0-100 % bewertet. Auch die Intensität der Farbreaktion wurde eingestuft und mit einem Score von 0 für keine, 1 für schwache, 2 für moderate und 3 für eine starke Anfärbung belegt, wobei immer die Positivkontrolle des jeweiligen Färbedurchgangs den Bezug für die Bewertung der Farbintensität bildete. Abschließend wurde die prozentuale Anfärbung von 0-100 mit dem Score der Farbintensität multipliziert, sodass sich ein „Flächen-Intensitäts-Score“ (FIS) bildete, der von 0 bis 300

reichen konnte. Diese Methode wurde in Anlehnung an die Arbeit der Gruppe Detre et al. etabliert (54). In dieser wurde dargestellt, dass die sog. „Quickscore“-Methode, in der die flächenhafte Anfärbung des gesamten Präparats geschätzt wird, der Auszählung angefärbter Zellen an zehn verschiedenen Punkten des Präparats nicht nachsteht und gleich gute Ergebnisse erzielt.

2.5 Neuronales Wachstums-Assay

2.5.1 Lagerung und Bebrütung der Eier

Befruchtete Valo-SPF-Eier (Vakzine Lohmann Spezifiziert Pathogen Frei Eier) wurden, falls nötig, in einem Kühlschrank bei 14 °C zwischengelagert, bevor sie für 8 bis 9 Tage in der Brutmaschine Modell 3000 bei 37 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit bebrütet wurden.

2.5.2 Versuchsaufbau des NWA

Es wurden Lab-Tek®-Chamber-Slide™-Systeme verwendet, um die Ganglien in verschiedenen PF unter gleichen Versuchsbedingungen zu inkubieren. Diese wurden zuvor zur besseren Haftung der Ganglien am Kammerboden mit Kollagen IV (1:50), in sterilem PBS verdünnt, ÜN bei 37 °C inkubiert, woraufhin die Lösung abgesaugt und die Kammern dreimal mit sterilem PBS gespült wurden. Jede Kammer wurde nun mit 125 µl PF versehen und mit 125 µl DMEM aufgefüllt. In jedem Versuch wurde als Positivkontrolle eine Kammer mit 0,1 ng/ml NGF 2.5S in 250 µl DMEM befüllt. Die Negativkontrolle lief unter der Verwendung der reinen DMEM ab.

2.5.3 Präparation der Hinterwurzelganglien

Die bebrüteten Eier wurden mit einem Alkoholtupfer desinfiziert und anschließend am stumpfen Ende mit einer großen Pinzette geöffnet. Die Hühnerembryonen wurden mit einer gebogenen Pinzette herausgenommen und in eine mit eiskaltem PBS gefüllte Petrischale gelegt. Daraufhin wurden sie sofort dekapitiert und der Körper wurde in eine neue Petrischale überführt, die ebenfalls mit PBS gefüllt war. Zur Freilegung der lumbalen Hinterwurzelganglien wurde der Hühnerembryonenkörper unter dem Binokular Wild M8 längs eröffnet und die Organe kopfwärts geschoben, um eine Sicht auf die Wirbelsäule zu ermöglichen. Die Ganglien lagen beidseitig neben den Wirbelkörperanlagen und konnten mit einer spitzen Pinzette gefasst und in einer weiteren, mit PBS befüllten, Petrischale gesammelt werden. Mindestens zwei Ganglien wurden anschließend in eine Kammer eines achtkammerigen Lab-Tek®- Chamber-Slide™-Systems gegeben. Im Folgenden wurden diese für 48 Stunden im Brutschrank

bei 37 °C unter 5 % CO₂ Begasung kultiviert. Der Versuch wurde für jede PF dreimal wiederholt, um die Ergebnisse verifizieren zu können.

2.5.4 Auswertung der Neuritenaussprossung

Nach 48 Stunden Inkubation in den PF wurden die Ganglien zur Auswertung der Neuritenaussprossung unter einem inversen Lichtmikroskop betrachtet und dokumentiert (Vergrößerung x5). Jedes Ganglion wurde einzeln analysiert und mittels eines Scores wurde die Dichte der ausgesprossenen Neuriten ermittelt. Hierbei stand 0 für keine Aussprossung, 1 für vereinzelte Neuriten, 2 für eine Neuritendichte > ¼ des Gangliondurchmessers und 3 für eine Neuritendichte >½ des Gangliondurchmessers.

2.5.5 Immunfluoreszenzanfärbung der Hinterwurzelganglien

Zuerst wurden die Kammern durch Abkippen der PF entleert und anschließend zweimal mit PBS gespült. Daraufhin wurden sie 8 min mit 200 µl einer 4 %igen Paraformaldehydlösung fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Ganglien 10 min mit je 200 µl 0,2 %iger Triton-X-100-Lösung inkubiert, um die Zellmembran für den AK permeabel zu machen und anschließend mit PBS gewaschen. Die Ganglien wurden zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen für 30 min bei RT mit FCS inkubiert. Dann wurden sie entweder mit dem AK gegen S100, *growth associated protein* (Gap) 43, einem Marker für neu ausgesprossene Nerven, oder Neurofilament (NF), einem Marker für myelinisierte Nervenfasern, benetzt und für 1 Stunde bei RT inkubiert (s. Tab. 5). Nun wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Hierzu dienten entweder Esel-Anti-Maus-IgG oder Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, die ebenfalls für 1 Stunde bei RT inkubiert wurden (s. Tab. 6). Nach einem zweimaligen Waschschrift mit Tris wurden die Ganglien mit Dapi Fluoromount G benetzt. Hierbei diente Dapi der Anfärbung von Zellkernen, um sicherzugehen, dass es sich bei den angefärbten Strukturen auch um Zellen handelt. Abschließend wurden die Ganglien eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop und wurde fotografisch festgehalten (Vergrößerung x10/ x200).

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde immer eine Negativkontrolle mit PBS-Lösung anstelle des Primärantikörpers angefertigt.

Tabelle 5: Primärantikörper des NWA.

Primärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
S100	1:400	Polyklonaler Kaninchen-Ak	Dako Corporation, USA
GAP 43	1:200	Monoklonaler Maus-Ak	Sigma Chemical Co., USA
NF (2F11)	1:50	Monoklonaler Maus-Ak	Dako Corporation, USA

Tabelle 6: Sekundärantikörper des NWA.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Eigenschaft	Hersteller
Esel-Anti-Maus-IgG	1:100	Esel-Ak	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG	1:100	Ziegen-Ak	Komabiotech, Korea

2.6 Statistische Auswertung

Die von der IHC-Analyse und dem NWA gewonnenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, USA) analysiert. Es wurden zum einen jeweils die Kontroll- und die Adenomyose-Gruppe miteinander verglichen und zum anderen mehrere Vergleiche innerhalb einer Gruppe unter verschiedenen Subgruppen durchgeführt. Für zwei unabhängige Variablen kam der nicht parametrische Mann-Whitney-Test zur Anwendung. War der Wert in einer Gruppe gleich, kam der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Um mehrere Gruppen miteinander zu vergleichen, wurden sie dem *Two-way ANOVA* mit einem Signifikanzniveau von 95 % unterzogen. Anschließend erfolgte ein paarweiser Datenvergleich mittels des *Post Hoc* Test nach Bonferroni. Nur Werte mit einem p-Wert von $p < 0,05$ wurden für signifikant gehalten und in Abbildungen mit einem * symbolisiert. P-Werte $< 0,01$ wurden mit ** und $p < 0,0001$ mit *** dargestellt. Werte mit $p < 0,07$ galten als tendenziell signifikant. Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Uterine Neurotrophin-Expression

3.1.1 Nachweis der Neurotrophin-Expression

Die Gewebeproben der Uteri aller Frauen wurden auf die Expression der Neurotrophine NGF und NT-3 untersucht. Die Expression wurde für alle Schichten des Uterus getrennt analysiert, wobei hier auch zwischen Epithel und Stroma unterschieden wurde. Um Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen, wurden diese miteinander verglichen.

3.1.2 NGF- und NT-3-Expression im Endometrium und der Junktionalzone

In der AM-G sowie der Ko-G wurde die Expression von NGF und NT-3 untersucht. Beide Nervenwachstumsfaktoren werden vor allem in Epithelzellen des SF und SB exprimiert. NGF-exprimierende Zellen finden sich auch im Stroma der gleichen Schichten und in der JZ. Eine im Vergleich schwache Expression wurde für NT-3-exprimierende Zellen in den Stromazellen des Endometriums und der JZ gesehen (s. Abb. 4).

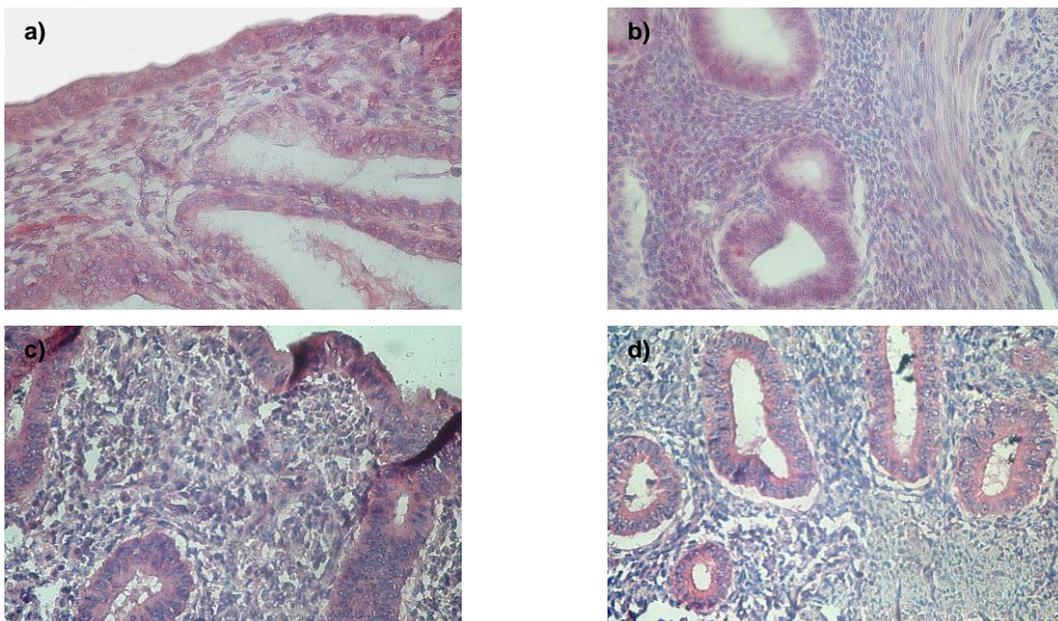


Abbildung 4: Immunhistochemische Darstellung des SB und SF in den Färbungen gegen NGF (a, b) und NT-3 (c, d), Vergrößerung x400. **a)** SF einer Patientin der AM-G, **b)** SB einer Patientin der AM-G, **c)** SF einer Patientin der Ko-G, **d)** SB einer Patientin der Ko-G.

Die Expression der Nervenwachstumsfaktoren innerhalb der einzelnen Schichten zeigte eine interindividuelle Variabilität; d. h. dass die Schichten meist nicht durchgehend in der gleichen Intensität angefärbt waren, sondern bestimmte Bereiche eine stärkere Expression zeigten und manche keine. Hierbei konnte kein genaues Muster festgestellt werden (s. Abb. 4).

Im Vergleich der AM-G und Ko-G miteinander ließen sich keine Unterschiede in der Expressionsstärke, mittels FIS angegeben, feststellen ($p > 0,05$; s. Abb. 4, Tab. 7). Jedoch war die Expression von NGF und NT-3 im Epithel des Endometriums im Bezug zum Stroma derselben Schicht innerhalb einer Gruppe signifikant höher ($p < 0,05$; s. Tab. 7).

Im Vergleich der FIS-Werte der NT-3-Färbung mit denen der NGF-Färbung zeigte sich in den Stromazellen aller Schichten ein signifikant höherer FIS für NGF (im SF und SB: $p < 0,0001$; in der JZ: $p < 0,05$; s. Tab. 7).

Tabelle 7: Flächen-Intensitäts-Score NGF- und NT-3-exprimierender Zellen in den einzelnen Uterusschichten, unterteilt in Epithel- und Stromagewebe, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. Der p-Wert bezieht sich auf die Signifikanz zwischen Epithel- und Stromazellen innerhalb einer Gruppe, * bezieht sich jeweils auf die NGF-exprimierenden Zellen in Bezug auf die NT-3-exprimierenden Zellen der gleichen Gruppe. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, SF=Stratum Functionale, SB=Stratum Basale, JZ=Junktionalzone.

		Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
		NGF	NT-3	NGF	NT-3
SF	Epithelzellen	187,63±121,75	180,66±102,88	155,47±117,32	192,82±93,44
	Stromazellen	102,24±88,00***	8,95±22,33	73,83±81,59***	12,90±43,24
	p-Wert	$p < 0,05$	$p < 0,0001$	$p < 0,05$	$p < 0,0001$
SB	Epithelzellen	192,89±113,81	195,00±94,38	184,92±108,41	198,59±92,02
	Stromazellen	103,42±87,08***	11,05±27,57	106,72±94,30***	3,44±12,79
	p-Wert	$p < 0,05$	$p < 0,0001$	$p < 0,01$	$p < 0,0001$
JZ		149,47±103,76*	75,13±58,77	115,08±95,15**	42,57±41,03

3.1.3 NGF- und NT-3-Expression im Myometrium und den AM-Herden

Die beiden Nervenwachstumsfaktoren NGF und NT-3 werden vor allem in Drüsenepithelzellen der Adenomyose-Herde exprimiert. NGF-exprimierende Zellen finden sich auch im Stroma der Herde und des Myometriums. NT-3 wird im Vergleich signifikant weniger im Stroma des Myometriums exprimiert ($p < 0,01$; s. Tab. 8). In der NGF-Färbung wurden auch Endothelzellen des Myometriums dargestellt, jedoch bei der Auswertung des MM nicht in den FIS einbezogen, da lediglich die Anfärbung von Epithel- und Stromazellen ausgewertet wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. In der AM-G ließ sich für beide Marker ebenso ein signifikant höherer Flächen-Intensitäts-Score im Drüsenepithel der Läsionsherde nachweisen als in deren Stromazellen ($p < 0,01$; s. Tab. 8). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich des FIS der AM-G mit dem der Ko-G ($p > 0,05$; s. Tab. 8).

Tabelle 8: Flächen-Intensitäts-Score NGF- und NT-3-exprimierender Zellen im MM und den AM-Herden, unterteilt in Epithel- und Stromagewebe, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. Der p-Wert bezieht sich auf die Signifikanz zwischen Epithel- und Stromazellen innerhalb einer Gruppe, * bezieht sich jeweils auf die NGF-exprimierenden Zellen in Bezug auf die NT-3-exprimierenden Zellen der gleichen Gruppe. *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$, MM=Myometrium, AM=Adenomyose.

		Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
		NGF	NT-3	NGF	NT-3
MM		173,68±98,66**	63,68±36,90	152,32±100,80***	56,85±50,08
AM-Herde	Epithelzellen			194,65±129,60	187,70±111,07
	Stromazellen			82,78±87,25	2,97±6,40
p-Wert				$p < 0,01$	$p < 0,0001$

3.1.4 NGF- und NT-3-Expression im Vergleich zwischen Myometrium und Endometrium

Im Vergleich der Expression von NGF und NT-3 im Myometrium mit den Stromazellen des Endometriums (Stratum Basale und Funktionale) zeigte sich für NGF und NT-3 ein signifikant höherer FIS im Myometrium beider Gruppen als im Endometrium ($p < 0,05$; s. Abb. 5).

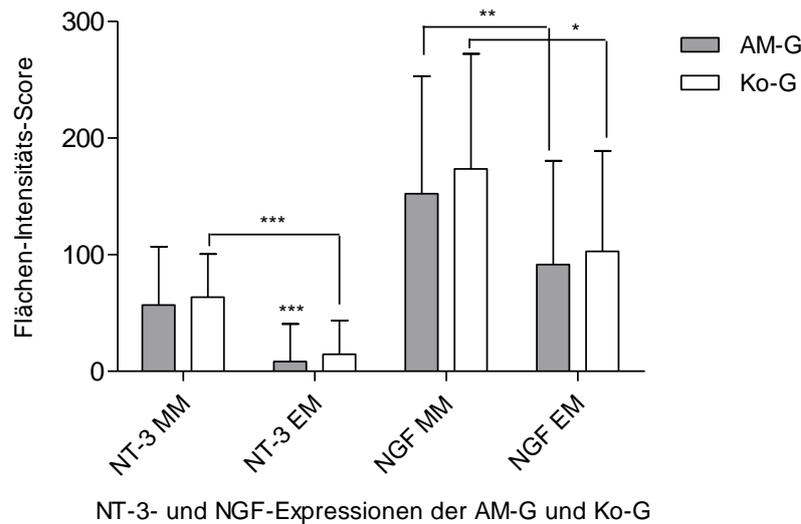


Abbildung 5: FIS NGF- und NT-3-exprimierender Zellen, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung im MM und Endometrium der AM-G und Ko-G. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

3.1.5 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Neurotrophin-Expression im MM und der JZ

Im Folgenden wurden verschiedene Faktoren betrachtet, die einen möglichen Einfluss auf die Neurotrophin-Expression des Uterus haben könnten.

Die Frauen beider Gruppen wurden unterteilt nach Zyklusphase, wobei in Sekretions- und Proliferationsphase unterschieden wurde, nach Hormonstatus, nach Anzahl der Schwangerschaften und Geburten sowie nach deren Schmerzanamnese. Ebenso wurde analysiert, ob das zusätzliche Vorkommen einer Endometriose bei den Frauen der AM-G im Vergleich mit dem Rest der AM-G und der Ko-G einen Unterschied in der Expression von NGF und NT-3 hervorruft. Es wurden jeweils die Gruppen eines Einflussfaktors innerhalb der AM-G und der Ko-G verglichen (z. B. Hormoneinnahme vs. keine Hormoneinnahme innerhalb der Ko-G) sowie die gleichen Gruppierungen

eines Faktors der AM-G gegen die Ko-G (z. B. keine Hormoneinnahme der AM-G vs. keine Hormoneinnahme Ko-G).

3.1.5.1 Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Zyklusphasen

Zur Analyse der Bedeutung der einzelnen Zyklusphasen wurden die Frauen nach Sekretions- und Proliferationsphase in zwei Gruppen unterteilt. Anschließend wurden alle Gruppen miteinander verglichen. Hierbei ließen sich weder für die NGF-, noch für die NT-3-Expression Unterschiede zwischen der AM-G und Ko-G feststellen ($p > 0,05$). Auch im Vergleich der Subgruppen innerhalb der AM-G bzw. Ko-G fanden sich keine signifikanten Differenzen ($p > 0,05$; s. Tab. 9).

Tabelle 9: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt in Proliferations- und Sekretionsphase; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
	Proliferationsphase	Sekretionsphase	Proliferationsphase	Sekretionsphase
MM	NGF: 171,67±105,83 NT-3: 65,56±47,27	NGF: 197,50±98,32 NT-3: 60,42±23,26	NGF: 111,96±100,58 NT-3: 56,43±40,83	NGF: 144,58±89,91 NT-3: 52,08±45,51
JZ	NGF: 150,00±114,51 NT-3: 72,22±67,87	NGF: 151,67±104,63 NT-3: 58,75±57,96	NGF: 85,45±90,18 NT-3: 31,88±27,82	NGF: 116,00±91,82 NT-3: 50,58±55,63
SB-Stroma	NGF: 90,00±69,55 NT-3: 11,67±33,17	NGF: 115,00±111,09 NT-3: 14,17±30,07	NGF: 52,50±79,24 NT-3: 0,00±0,00	NGF: 98,50±81,27 NT-3: 6,25±7,50
SB-Epithel	NGF: 194,44±123,60 NT-3: 212,78±72,68	NGF: 202,50±110,98 NT-3: 156,67±121,11	NGF: 156,82±116,82 NT-3: 218,75±91,16	NGF: 227,00±64,77 NT-3: 176,25±123,52
SF-Stroma	NGF: 110,56±68,17 NT-3: 5,56±14,88	NGF: 86,67±110,53 NT-3: 17,50±35,74	NGF: 32,27±65,28 NT-3: 1,25±4,33	NGF: 90,00±45,00 NT-3: 5,00±8,66
SF-Epithel	NGF: 187,78±119,11 NT-3: 189,44±76,75	NGF: 191,67±141,80 NT-3: 126,25±138,54	NGF: 123,18±119,67 NT-3: 213,54±79,99	NGF: 222,00±61,09 NT-3: 200,00±173,21

3.1.5.2 Neurotrophin-Expression in Bezug auf den Hormonstatus

Um den Einfluss von Hormonen auf die Neurotrophin-Expression zu bestimmen, wurden auch hier die Frauen nach dem Status der Hormoneinnahme unterteilt, sodass sich eine Gruppe mit und eine ohne jegliche Hormoneinnahme bildete; innerhalb der Frauen der AM-G, die Hormone einnahmen, wurden nochmals zwischen oralen Kontrazeptiva und GnRH-Analoga unterschieden. Jedoch ließen sich weder innerhalb der AM-G oder der Ko-G, noch zwischen den beiden Gruppen Unterschiede in der Expression von NGF oder NT-3 feststellen ($p > 0,05$; s. Tab. 10).

Tabelle 10: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt in Gruppen mit und ohne Hormoneinnahme; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe		
	Keine Hormone	Hormone	Keine Hormone	Orale Kontrazeptiva	GnRH-Analoga
MM	NGF: 184,69±97,32 NT-3: 65,78±38,23	NGF: 115,00±102,10 NT-3: 52,50±32,69	NGF: 141,63±98,97 NT-3: 50,10±39,66	NGF: 180,25±100,02 NT-3: 67,50±66,26	NGF: 176,50±99,34 NT-3: 75,00±69,91
JZ	NGF: 155,31±104,82 NT-3: 68,91±60,74	NGF: 118,33±112,95 NT-3: 108,33±38,19	NGF: 102,50±95,49 NT-3: 35,67±36,82	NGF: 137,14±73,89 NT-3: 66,43±46,07	NGF: 120,83±99,51 NT-3: 37,50±54,14
SB-Stroma	NGF: 100,31±82,73 NT-3: 11,88±29,99	NGF: 120,00±128,16 NT-3: 6,67±7,64	NGF: 92,27±96,12 NT-3: 4,32±15,14	NGF: 102,86±49,32 NT-3: 2,14±5,67	NGF: 181,67±125,53 NT-3: 0,00±0,00
SB-Epithel	NGF: 197,81±110,77 NT-3: 197,19±95,99	NGF: 166,67±152,75 NT-3: 183,33±104,08	NGF: 179,55±111,90 NT-3: 185,68±100,51	NGF: 187,50±117,48 NT-3: 221,43±69,86	NGF: 243,33±98,15 NT-3: 240,00±65,57
SF-Stroma	NGF: 103,13±82,22 NT-3: 9,69±24,18	NGF: 97,50±137,68 NT-3: 5,00±8,66	NGF: 54,32±69,58 NT-3: 8,57±32,72	NGF: 83,21±70,25 NT-3: 28,57±73,41	NGF: 195,00±105,00 NT-3: 6,67±7,64
SF-Epithel	NGF: 193,44±120,59 NT-3: 172,66±107,94	NGF: 156,67±150,44 NT-3: 223,33±68,07	NGF: 134,55±115,28 NT-3: 181,31±103,81	NGF: 190,00±127,93 NT-3: 202,86±98,54	NGF: 228,33±88,08 NT-3: 250,00±50,00

3.1.5.3 Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Gravidität

Ebenso sollte die Beeinflussung der NF-Dichte durch die Gravidität der Frauen betrachtet werden. Hierfür wurden die Frauen in eine Gruppe der Nulligravida und der Multigravida eingeteilt und verglichen. Es ließen sich für NGF und NT-3 keine Unterschiede feststellen - weder innerhalb der AM-G und Ko-G, noch im Vergleich miteinander ($p > 0,05$; s. Tab. 11).

Tabelle 11: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt in Nulligravida und Gravida; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
	Nulligravida	Gravida	Nulligravida	Gravida
MM	NGF: 162,00±91,49 NT-3: 56,50±35,34	NGF: 177,86±104,07 NT-3: 66,25±38,39	NGF: 156,00±106,27 NT-3: 56,00±51,65	NGF: 152,93±100,07 NT-3: 56,21±51,95
JZ	NGF: 155,00±112,97 NT-3: 63,50±62,29	NGF: 147,50±104,71 NT-3: 79,29±59,32	NGF: 105,00±108,17 NT-3: 22,50±31,82	NGF: 112,31±88,34 NT-3: 42,05±42,51
SB-Stroma	NGF: 61,00±39,27 NT-3: 35,00±48,73	NGF: 118,57±95,32 NT-3: 2,50±4,70	NGF: 145,00±69,28 NT-3: 0,00±0,00	NGF: 98,52±93,59 NT-3: 3,93±13,63
SB-Epithel	NGF: 160,00±108,40 NT-3: 193,00±123,47	NGF: 204,64±117,28 NT-3: 195,71±87,42	NGF: 245,00±95,26 NT-3: 150,00±212,13	NGF: 183,06±108,27 NT-3: 201,96±87,66
SF-Stroma	NGF: 58,00±35,46 NT-3: 19,00±39,75	NGF: 118,04±96,51 NT-3: 5,36±12,32	NGF: 125,00±105,36 NT-3: 7,50±10,61	NGF: 66,20±77,29 NT-3: 14,07±46,27
SF-Epithel	NGF: 160,00±135,05 NT-3: 163,00±108,83	NGF: 197,50±120,48 NT-3: 186,96±104,15	NGF: 205,00±164,54 NT-3: 122,50±109,60	NGF: 149,44±112,03 NT-3: 197,50±94,93

3.1.5.4 Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Parität

Weiterhin sollte die Bedeutung der Geburten der Frauen auf die Expression der Nervenwachstumsfaktoren betrachtet werden. Abermals wurden die Frauen in eine Gruppe der Nullipara ohne Kinder und der Multipara mit ≥ 1 Kind eingeteilt und deren Ergebnisse evaluiert. Hier ließen sich für beide Neurotrophine weder Unterschiede zwischen den gleichen Subgruppen der AM-G und Ko-G, noch innerhalb der Gruppen feststellen ($p > 0,05$; s. Tab. 12).

Tabelle 12: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt in Nullipara und Multipara; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
	Nullipara	Multipara	Nullipara	Multipara
MM	NGF: 185,00±92,16 NT-3: 63,06±36,31	NGF: 163,50±108,04 NT-3: 64,25±39,37	NGF: 129,77±96,83 NT-3: 58,64±46,43	NGF: 162,24±100,63 NT-3: 55,26±53,71
JZ	NGF: 149,44±110,27 NT-3: 84,17±63,02	NGF: 149,50±103,56 NT-3: 67,00±56,77	NGF: 90,00±90,43 NT-3: 36,07±36,57	NGF: 118,15±88,72 NT-3: 42,17±43,85
SB-Stroma	NGF: 75,00±66,43 NT-3: 20,56±38,60	NGF: 129,00±98,54 NT-3: 2,50±4,86	NGF: 133,57±98,94 NT-3: 0,00±0,00	NGF: 93,91±89,44 NT-3: 4,78±14,96
SB-Epithel	NGF: 178,89±115,70 NT-3: 189,44±102,97	NGF: 205,50±116,77 NT-3: 200,00±91,29	NGF: 211,07±87,49 NT-3: 217,14±109,04	NGF: 182,61±113,42 NT-3: 192,83±91,20
SF-Stroma	NGF: 83,89±70,88 NT-3: 11,67±29,58	NGF: 118,75±101,89 NT-3: 6,50±14,35	NGF: 127,14±105,15 NT-3: 5,00±7,07	NGF: 55,33±64,96 NT-3: 16,36±51,11
SF-Epithel	NGF: 178,33±128,87 NT-3: 151,39±114,82	NGF: 196,00±121,33 NT-3: 207,00±88,45	NGF: 206,43±107,11 NT-3: 213,57±86,83	NGF: 139,35±115,96 NT-3: 185,57±99,38

3.1.5.5 Neurotrophin-Expression in Bezug auf die Schmerzanamnese

Es sollte evaluiert werden, ob das Vorhandensein von Schmerzen einen Einfluss auf die Expressionsstärke der neurotrophen Wachstumsfaktoren hat. Hierzu wurden die Frauen erneut unterteilt in eine Gruppe mit und eine ohne Schmerzen. Die Frauen der AM-G mit Schmerzen wurden zudem nach Schmerzart unterteilt in eine Gruppe mit Unterbauchschmerzen, Dysmenorrhoe sowie Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe. Es konnte weder innerhalb der AM-G und Ko-G ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit und ohne Schmerzen festgestellt werden, noch zwischen AM-G und Ko-G ($p > 0,05$; s. Tab. 13).

Tabelle 13: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Schmerzvorkommen; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
	Keine Schmerzen	Schmerzen	Keine Schmerzen	Schmerzen
MM	NGF: 163,50±82,90 NT-3: 58,75±36,95	NGF: 185,00±117,87 NT-3: 69,17±38,24	NGF: 133,15±93,31 NT3: 46,52±44,14	NGF: 173,95±106,04 NT-3: 69,34±55,05
JZ	NGF: 142,50±105,18 NT-3: 80,50±64,09	NGF: 157,22±107,94 NT-3: 69,17±55,45	NGF: 112,35±83,29 NT3: 27,35±33,74	NGF: 111,17±99,89 NT-3: 59,82±42,73
SB-Stroma	NGF: 114,00±86,95 NT-3: 13,00±31,02	NGF: 91,67±90,90 NT-3: 8,85±24,85	NGF: 92,50±88,27 NT-3: 0,00±0,00	NGF: 114,83±97,31 NT-3: 7,33±18,21
SB-Epithel	NGF: 201,50±116,24 NT-3: 210,50±84,80	NGF: 183,33±117,26 NT-3: 177,78±106,39	NGF: 205,59±109,81 NT-3: 167,65±102,85	NGF: 166,50±110,40 NT-3: 233,67±64,65
SF-Stroma	NGF: 110,25±81,84 NT-3: 3,00±5,37	NGF: 93,33±98,58 NT-3: 15,56±31,57	NGF: 88,09±91,10 NT-3: 2,35±5,04	NGF: 57,67±68,76 NT-3: 25,71±62,94
SF-Epithel	NGF: 194,00±103,84 NT-3: 207,50±98,02	NGF: 180,56±145,31 NT-3: 150,83±105,39	NGF: 192,06±116,06 NT-3: 171,03±100,17	NGF: 114,00±107,79 NT-3: 219,29±80,14

Auch zwischen den verschiedenen Schmerzarten der Frauen der AM-G mit Schmerzen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$; s. Tab. 14).

Tabelle 14: FIS der einzelnen Uterusschichten der AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Dysmenorrhoe, Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe mit Unterbauchschmerzen; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Adenomyose-Gruppe		
	Dysmenorrhoe	Unterbauchschmerz	DM & US
MM	NGF: 18,71±10,29 NT-3: 88,93±65,35	NGF: 18,86±10,38 NT-3: 63,57±52,66	NGF: 15,75±14,80 NT-3: 58,75±44,60
JZ	NGF: 18,33±10,86 NT-3: 66,76±46,18	NGF: 10,00±9,51 NT-3: 53,00±49,32	NGF: 6,33±4,62 NT-3: 75,00±0,00
SB-Stroma	NGF: 17,17±10,01 NT-3: 4,29±7,32	NGF: 12,00±11,22 NT-3: 16,00±30,50	NGF: 7,00±5,57 NT-3: 0,00±0,00
SB-Epithel	NGF: 22,50±8,73 NT-3: 214,29±69,01	NGF: 15,30±10,97 NT-3: 251,00±50,05	NGF: 12,00±15,59 NT-3: 225,00±106,07
SF-Stroma	NGF: 9,67±8,73 NT-3: 2,14±5,67	NGF: 4,80±5,45 NT-3: 37,50±75,00	NGF: 5,33±8,39 NT-3: 97,50±137,89
SF-Epithel	NGF: 11,67±10,15 NT-3: 206,43±101,85	NGF: 12,80±11,80 NT-3: 245,00±43,01	NGF: 11,00±16,52 NT-3: 172,50±31,82

3.1.5.6 Neurotrophin-Expression bei Frauen mit Koinzidenz einer AM und EM

Acht Frauen der AM-G hatten zusätzlich eine EM. Um zu analysieren, welchen Stellenwert die Koinzidenz beider Erkrankungen der Frauen hatte, wurden sie mit den 34 restlichen Frauen der AM-G und der Ko-G verglichen. Für die NGF- sowie die NT-3-Expression ergab der Vergleich der Gruppen miteinander keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; s. Tab. 15).

Tabelle 15: FIS der einzelnen Uterusschichten der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach zusätzlichem Vorkommen von Endometriose in der AM-G; MM=Myometrium, JZ=Junktionalzone.

	Kontrollgruppe	Adenomyose-Gruppe	
	(n=19)	ohne Endometriose (n=34)	mit Endometriose (n=8)
MM	NGF: 173,68±98,66 NT-3: 63,68±36,90	NGF: 151,18±97,39 NT-3: 49,34±46,58	NGF: 153,44±118,45 NT-3: 88,75±55,02
JZ	NGF: 149,47±103,76 NT-3: 75,13±58,77	NGF: 113,89±86,15 NT-3: 39,46±40,95	NGF: 100,00±119,27 NT-3: 64,38±39,71
SB-Stroma	NGF: 103,42±87,08 NT-3: 11,05±27,57	NGF: 90,19±82,88 NT-3: 3,93±13,64	NGF: 172,00±116,60 NT-3: 0,00±0,00
SB-Epithel	NGF: 192,89±113,81 NT-3: 195,00±94,38	NGF: 186,20±105,45 NT-3: 201,96±95,74	NGF: 193,00±147,04 NT-3: 175,00±64,55
SF-Stroma	NGF: 102,24±88,00 NT-3: 8,95±22,33	NGF: 61,20±67,58 NT-3: 14,63±46,18	NGF: 142,00±122,56 NT-3: 1,25±2,50
SF-Epithel	NGF: 187,63±121,75 NT-3: 180,66±102,88	NGF: 154,63±117,40 NT-3: 196,39±96,58	NGF: 160,00±130,62 NT-3: 168,75±74,65

3.1.6 Nachweis von Nervenfasern im Uterus

42 Gewebeproben des Uterus von Frauen mit AM und 19 Proben von Frauen der Ko-G wurden immunhistochemisch mit den neuronalen Markern S100 und PGP9.5 und den Rezeptoren neuronaler Wachstumsfaktoren p75^{NTR} und TrkA auf das Vorkommen von NF in allen Schichten des Uterus untersucht. Anschließend wurden die Ergebnisse beider Gruppen sowie die einzelnen Schichten des Uterus miteinander verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss der verschiedenen Zyklusphasen, des Hormonstatus, der Parität und Gravidität, der Schmerzen und der Koinzidenz von EM bei den Frauen der AM-G betrachtet.

3.1.7 Nervenfaserdichte des Stratum Functionale und Stratum Basale sowie der Junktionalzone

Zum Nachweis von NF wurden insgesamt 61 Gewebeproben des Uterus gegen S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Im gesamten Endometrium und der Junktionalzone beider Gruppen ließen sich fast keine NF darstellen. Hierbei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Adenomyose- und der Kontrollgruppe. Nur vereinzelt zeigten sich S100-positive NF im Stratum Basale und der Junktionalzone der Kontrollgruppe (s. Tab. 16, Abb. 6).

Tabelle 16: NF/mm² im Endometrium und der JZ der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA.

	Kontrollgruppe	Adenomyose-Gruppe
Stratum Funktionale	S100 0,00±0,00 PGP9.5 0,00±0,00 p75 0,00±0,00 TrkA 0,00±0,00	S100 0,14±0,50 PGP9.5 0,00±0,00 p75 0,00±0,00 TrkA 0,00±0,00
Stratum Basale	S100 0,9±1,72 PGP9.5 0,25±0,73 p75 0,63±1,09 TrkA 0,00±0,00	S100 0,59±1,06 PGP9.5 0,18±0,92 p75 0,54±1,34 TrkA 0,00±0,00
Junktionalzone	S100 1,40±1,95 PGP9.5 0,19±0,42 p75 0,84±1,14 TrkA 0,07±0,26	S100 0,46±0,66 PGP9.5 0,07±0,40 p75 0,69±1,55 TrkA 0,09±0,29

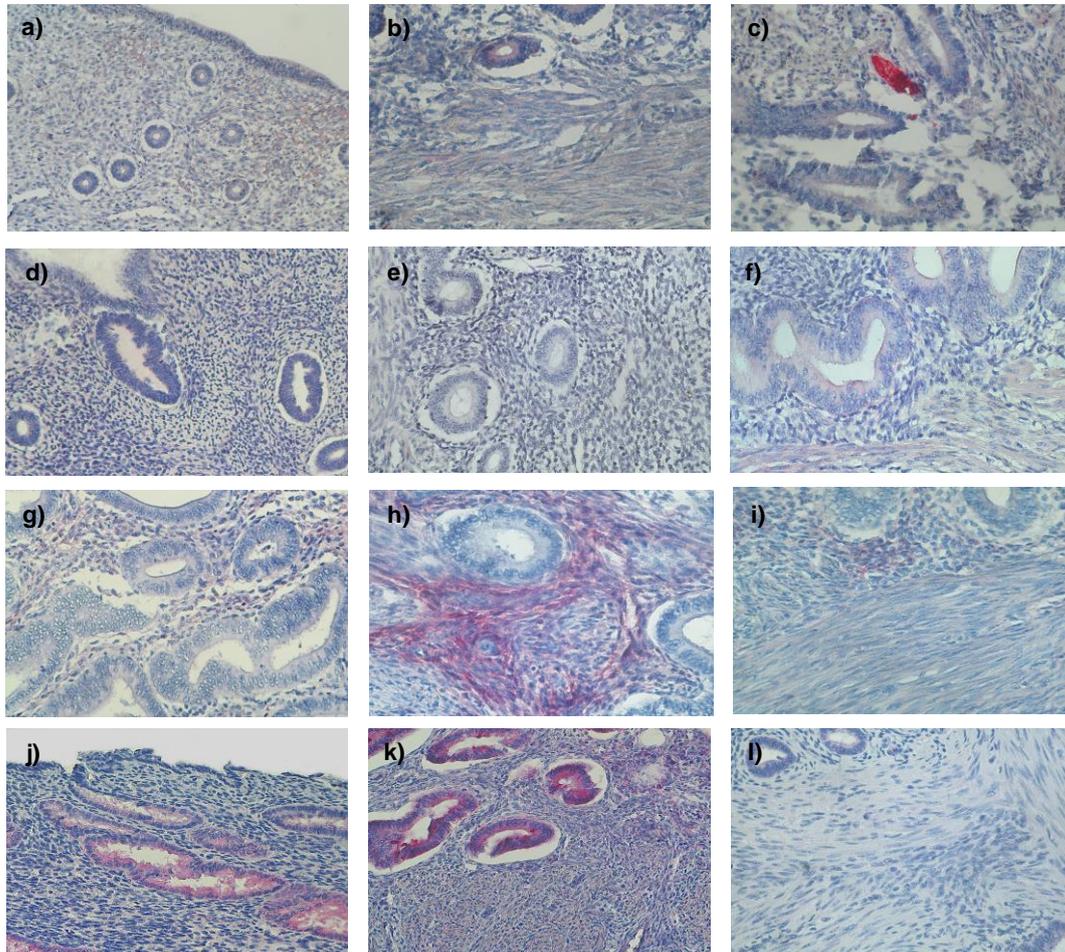


Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung des SF, SB und der JZ der Ko-G in den Färbungen gegen S100 (a: SF, b: SB, c: JZ mit myelinisierter NF), PGP9.5 (d: SF, e: SB, f: JZ), p75^{NTR} (g: SF, h: SB, i: JZ) und TrkA (j: SF, k: SB, l: JZ), Vergrößerung x400.

Im genaueren Vergleich der Junktionalzone beider Gruppen fiel auf, dass sich die Nervenfasern in der Ko-G in unmittelbarer Nähe von Gefäßen befanden (s. Abb. 7a), während die NF der AM-G unabhängig vom Gefäßvorkommen sichtbar waren (s. Abb. 7b).

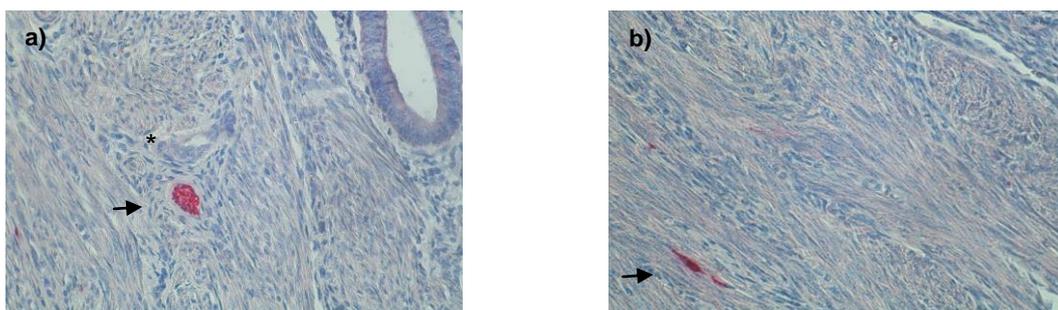


Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung von NF (schwarze Pfeile) in der JZ in der Färbung gegen S100, Vergrößerung x400. a) NF einer Patientin der Ko-G neben Gefäß (Sternchen), b) NF einer Patientin der AM-G.

Es wurden auch vereinzelt S100-positive Zellen im Stroma des Stratum Funktionale, des Stratum Basale und der Junktionalzone gesehen.

Bei acht Patientinnen der AM-G und acht Patientinnen der Ko-G wurden mittels S100 große myelinisierte Trunci im SB und der JZ beobachtet (s. Abb. 8). Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der myelinisierten Trunci zwischen der AM-G und Ko-G festgestellt werden (NF/mm² im SB und der JZ zusammen, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung: AM-G: $3,4 \pm 1,98$; Ko-G: $4,63 \pm 1,06$; $p > 0,05$).

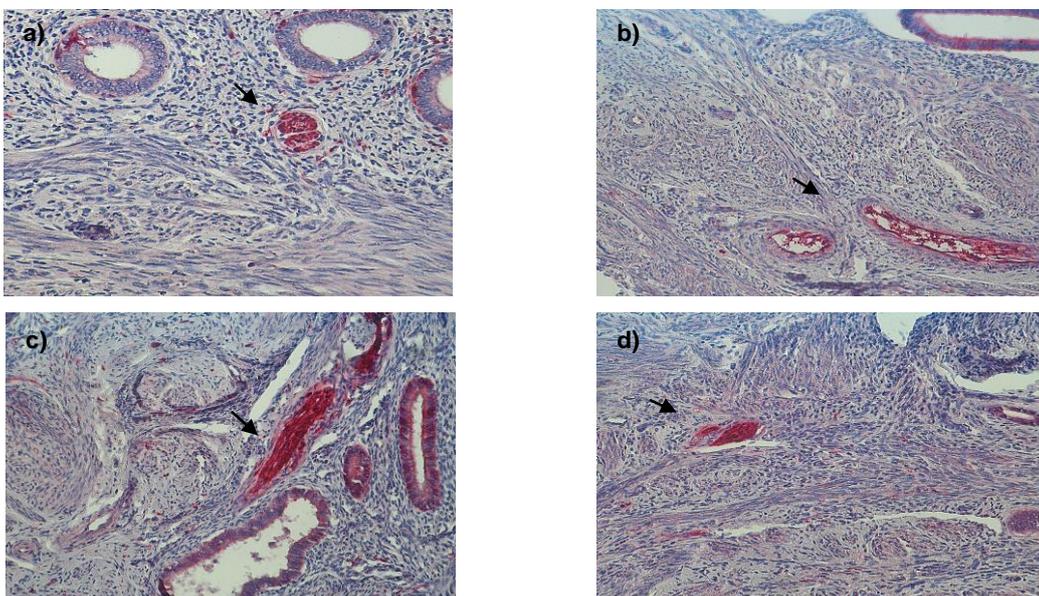


Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung S100-positiver, myelinisierter Trunci im SB und der JZ (schwarze Pfeile), Vergrößerung x400. **a)** SB einer Patientin der AM-G, **b)** JZ einer Patientin der AM-G, **c)** SB einer Patientin der Ko-G, **d)** JZ einer Patientin der Ko-G.

Eine Korrelation zwischen dem Vorkommen großer Trunci im SB und der JZ und einer Koinzidenz von Endometriose bei den Frauen der AM-G konnte nicht beobachtet werden, da keine der Frauen der AM-G eine zusätzliche EM aufwies. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen der Schmerzanamnese der Frauen oder der Hormoneinnahme, weder in der Gruppe der Frauen mit AM, noch in der Kontrollgruppe, hergestellt werden ($p > 0,05$; s. Tab. 17).

Tabelle 17: NF/mm² S100-positiver Trunci im SB und der JZ der AM-G und Ko-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Hormoneinnahme und Schmerzpathogenese.

	Adenomyose-Gruppe			Kontrollgruppe		
	SB	JZ	n	SB	JZ	n
Hormone	1,90±2,04	0,90±1,24	5			0
Keine Hormone	0,83±0,76	0,33±0,29	3	1,94±2,19	2,38±2,36	8
Schmerzen	1,50±1,47	1,13±1,31	4	1,00±0,50	2,50±2,60	3
Keine Schmerzen	1,50±2,12	0,25±0,29	4	2,50±2,69	2,30±2,51	5

3.1.8 Nervenfaserdichte im Myometrium und den Adenomyose-Herden

Im Myometrium beider Gruppen zeigten sich positive Nervenfasern für die zwei neuronalen Marker S100 und PGP9.5 und die Marker der Rezeptoren der Nervenwachstumsfaktoren p75^{NTR} und TrkA (s. Tab. 18, Abb. 9). Diese traten im gesamten Myometrium, unabhängig von Gefäßen, und auch in Gefäß-Nerven-Bündel auf. Es wurden auch vereinzelte S100- und p75^{NTR}-positive Zellen im Myometrium beider Gruppen detektiert, die im gesamten Myometrium sichtbar waren und keiner bestimmten Anordnung folgten. In der Nervenfaserdichte gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Adenomyose- und Kontrollgruppe ($p > 0,05$, s. Tab. 18, Abb. 10).

Tabelle 18: NF/mm² im MM beider Gruppen und in den AM-Herden der AM-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung.

	Kontrollgruppe	Adenomyose-Gruppe	
	Myometrium	AM-Herde	Myometrium
S100	4,63±2,65	0,38±0,78	3,88±2,93
PGP9.5	2,84±1,54	0,06±0,20	2,12±1,27
p75^{NTR}	3,74±2,23	0,33±0,60	2,88±2,20
TrkA	1,29±1,05	0,09±0,30	1,37±0,77

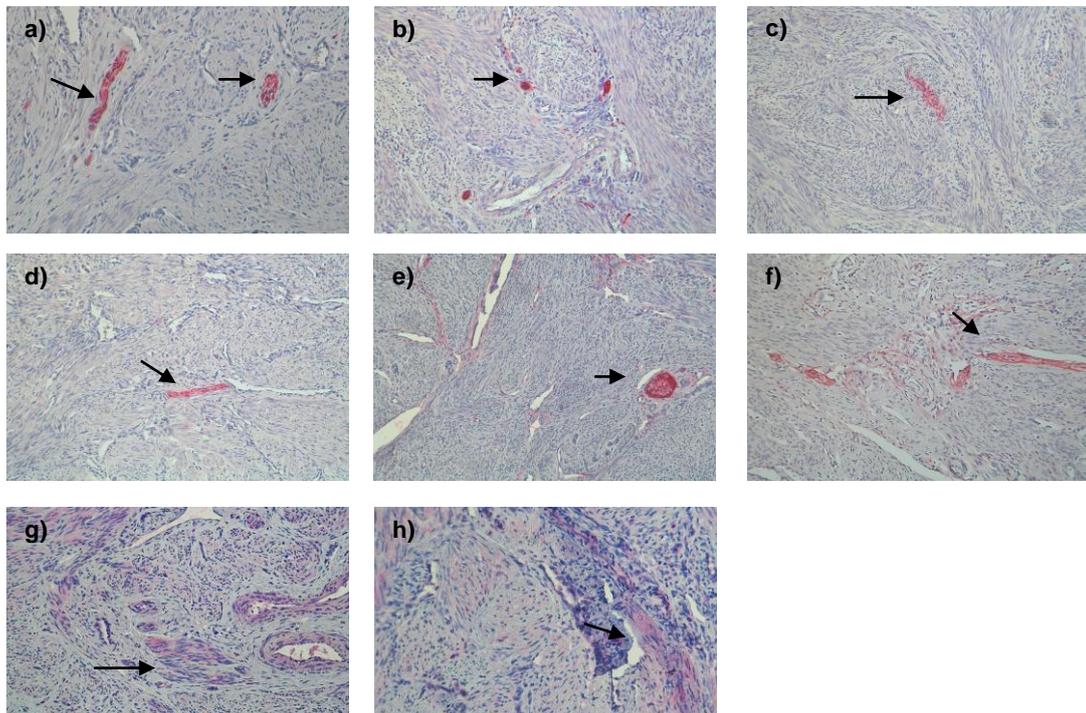


Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung von NF (schwarze Pfeile) im Myometrium in den Färbungen gegen S100 (a: AM-G, b: Ko-G), PGP9.5 (c: AM-G, d: Ko-G), p75^{NTR} (e: AM-G, f: Ko-G) und TrkA (g: AM-G, h: Ko-G), Vergrößerung x200.

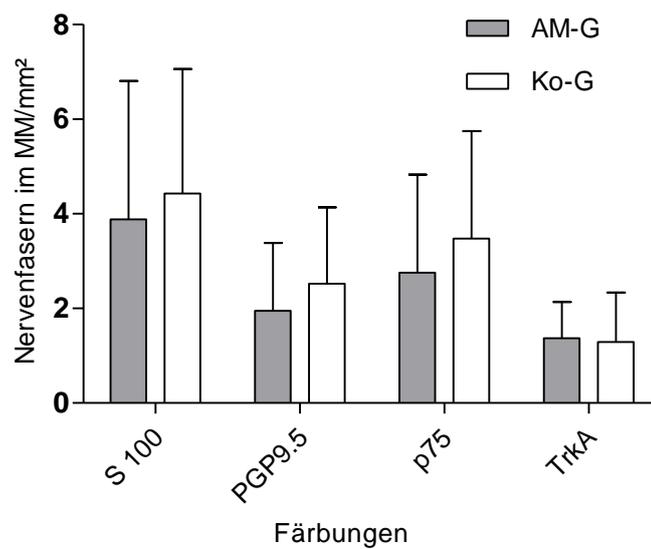


Abbildung 10: NF/mm² des MM der AM-G und Ko-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung.

S100-, PGP9.5-, p75^{NTR}- und TrkA- positive Nervenfasern wurden im Mittel nicht in den Adenomyose-Herden der AM-G dargestellt (s. Tab. 18 und Abb. 11a). Jedoch waren auch vereinzelt in den AM-Herden und in deren unmittelbarer Umgebung S100-positive Zellen sichtbar. In zwei der 42 Uterusschnitte der Frauen mit AM fanden sich in der S100-Färbung große myelinisierte Nervenfasern (s. Abb. 11b).

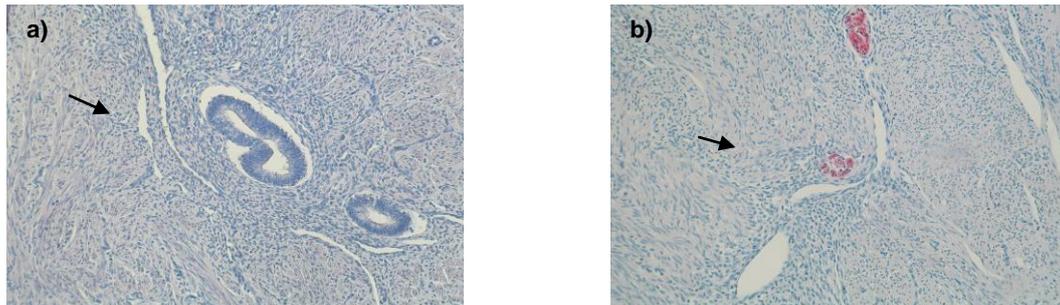


Abbildung 11: AM-Herde in der S100-Färbung (dargestellt mittels schwarzer Pfeile), Vergrößerung x200. **a)** AM-Herd ohne NF, **b)** AM-Herd mit großer NF.

3.1.9 Fis-Score von Endometrium, Myometrium und Adenomyose-Herden

Die IHC-Analysen zeigten zusätzlich eine flächenhafte Expression, die, gegen p75^{NTR} gefärbt, das Stromagewebe und in der TrkA Färbung eher das Epithel des Endometriums und der AM-Herde betraf. Demnach war das Myometrium in der AM-G sowie der Ko-G durch p75^{NTR} stärker angefärbt als durch TrkA, welches nur eine sehr schwache Färbung zeigte ($p < 0,0001$, s. Tab. 19). Zwischen der AM-G und der Ko-G wurden keine Unterschiede in den Expressionen von TrkA oder p75^{NTR} deutlich ($p > 0,05$, s. Tab. 19).

Tabelle 19: FIS der TrkA- und p75^{NTR}-Expression in MM, JZ, Endometrium und AM-Herden, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung. ** $p < 0,0001$ (im Vergleich zwischen TrkA und p75^{NTR}).

	TrkA		p75 ^{NTR}	
	Ko-G	AM-G	Ko-G	AM-G
Myometrium	37,50±26,97**	42,93±41,68**	158,82±91,46	144,58±85,90
Stratum Basale-Stroma	6,00±11,05	1,57±5,25	146,47±96,15	135,83±106,30
Stratum Basale-Epithel	234,00±75,10	142,86±110,86	0,00±0,00	0,00±0,00
Stratum Funktionale-Stroma	9,00±15,38	2,50±7,41	41,11±34,52	46,17±70,47
Stratum Funktionale-Epithel	211,00±104,49	116,99±100,25	0,00±0,00	0,00±0,00
Läsion-Stroma	0,00±0,00	2,03±6,20	0,00±0,00	135,30±102,43
Läsion-Epithel	0,00±0,00	211,41±101,66	0,00±0,00	0,00±0,00

3.1.10 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Nervenfaserdichte im MM und der JZ

Wie auch schon die Analyse verschiedener Einflüsse auf die Neurotrophin-Expression des Uterus stattgefunden hat, sollten hier die gleichen Einflüsse analysiert werden, die die NF-Dichte des MM und der JZ beeinträchtigen können.

Hierzu wurden die Frauen erneut unterteilt nach Zyklusphase, wobei in Sekretions- und Proliferationsphase unterschieden wurde, nach Hormonstatus, nach Anzahl der Schwangerschaften und Geburten sowie nach deren Schmerzanamnese. Es fand auch eine Unterteilung der AM-G in eine Gruppe mit Endometriose und eine Gruppe ohne Endometriose statt.

Hierbei wurden lediglich Myometrium und Junktionalzone betrachtet, da, wie oben dargestellt, im Endometrium keine NF darstellbar waren.

3.1.10.1 Nervenfaserdichte in Bezug auf die Zyklusphasen

Um den möglichen Einfluss der verschiedenen Zyklusphasen auf die Nervenfaserdichte in den Gewebeschnitten der Frauen zu analysieren, wurden diese in Proliferations- und Sekretionsphase unterteilt, weiterhin wurden die Phasen innerhalb der AM-G und Ko-G und die beiden Gruppen miteinander verglichen. Es ließen sich keine Unterschiede im Vergleich von AM-G und Ko-G miteinander oder zwischen Sekretions- oder Proliferationsphase in der AM-G und Ko-G feststellen ($p > 0,05$, s. Tab. 20).

Tabelle 20: NF/mm² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Proliferations- und Sekretionsphase.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe					
	Proliferationsphase	Sekretionsphase	Proliferationsphase	Sekretionsphase				
MM	S100	4,67±2,74	S100	5,00±2,00	S100	4,07±3,22	S100	5,17±2,23
	PGP9.5	2,67±1,73	PGP9.5	3,33±1,21	PGP9.5	1,93±1,14	PGP9.5	3,00±1,26
	p75	3,78±2,28	p75	4,33±2,80	p75	2,29±2,02	p75	5,00±2,10
	TrkA	1,63±1,51	TrkA	1,00±0,00	TrkA	1,23±0,83	TrkA	1,67±0,82
JZ	S100	1,56±2,04	S100	2,00±2,17	S100	0,33±0,39	S100	0,17±0,29
	PGP9.5	0,33±0,56	PGP9.5	0,08±0,20	PGP9.5	0,08±0,19	PGP9.5	0,00±0,00
	p75	0,31±1,19	p75	0,75±1,25	p75	0,86±1,69	p75	1,50±2,68
	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,08±0,29	TrkA	0,20±0,45

3.1.10.2 Nervenfaserdichte in Bezug auf den Hormonstatus

Auch der eventuelle Einfluss der Hormoneinnahme auf die NF-Dichte wurde untersucht, indem jeweils in beiden Gruppen zwischen den Frauen mit und ohne Hormoneinnahme unterschieden wurde. Erneut wurde in der Gruppe der AM-G die Hormongruppe in die oralen Kontrazeptiva und die GnRH-Analoga unterschieden. Hierbei waren in den Expressionen aller vier neuronalen Marker S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA sowohl im MM als auch in der JZ keine signifikanten Unterschiede feststellbar ($p > 0,05$). Im Vergleich der Frauen mit und ohne Hormoneinnahme untereinander sah man eine verminderte Nervenfaserdichte bei den Frauen mit Hormoneinnahme, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$; s. Tab. 21).

Tabelle 21: NF/mm² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Einnahme von Hormonen.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe							
	Keine Hormone		Hormone		Keine Hormone		Orale Kontrazeptiva		GnRH-Analoga	
MM	S100	4,54±3,26	S100	2,81±1,94	S100	4,54±3,26	S100	2,90±2,00	S100	2,60±2,10
	PGP9.5	2,88±1,50	PGP9.5	2,67±2,08	PGP9.5	2,35±1,32	PGP9.5	1,50±1,20	PGP9.5	2,20±0,80
	p75	4,00±2,34	p75	2,33±0,58	p75	3,27±2,36	p75	2,30±1,83	p75	2,20±2,17
	TrkA	1,36±1,15	TrkA	1,00±0,00	TrkA	1,41±0,80	TrkA	1,10±0,74	TrkA	1,40±0,50
JZ	S100	1,44±1,95	S100	1,00±0,00	S100	0,43±0,51	S100	0,31±0,46	S100	1,00±1,41
	PGP9.5	0,22±0,45	PGP9.5	0,00±0,00	PGP9.5	0,10±0,26	PGP9.5	0,05±0,16	PGP9.5	0,00±0,00
	p75	1,03±1,17	p75	0,00±0,00	p75	1,05±1,68	p75	0,19±0,37	p75	0,00±0,00
	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,14±0,34	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,00±0,00

3.1.10.3 Nervenfaserdichte in Bezug auf die Gravidität

Zusätzlich wurde die Beeinflussung der Nervenfaserdichte durch die Gravidität betrachtet, indem die Frauen in Nulligravida und Gravida unterteilt wurden.

Innerhalb der Ko-G zeigte sich im MM in der Expression von S100, PGP9.5 und p75^{NTR} eine tendenziell erniedrigte NF-Aussprossung der Multigravida der Ko-G im Vergleich zu den Nulligravida der Ko-G ($p < 0,07$, s. Tab. 22). Die TrkA-Expression zeigte in der Ko-G keine signifikanten Unterschiede der NF-Dichte zwischen den Multigravida und Gravida ($p > 0,05$; s. Tab. 22). In der Adenomyose-Gruppe sah man für keinen neuronalen Marker einen signifikanten Unterschied in der Expression der NF zwischen der Gruppe der Nulligravida und der Gravida ($p > 0,05$; s. Tab. 22). Im Vergleich der Gravida der AM-G mit denen der Ko-G sowie im Vergleich der Nulligravida der AM-G

mit denen der Ko-G ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen ($p > 0,05$, s. Tab. 22).

Tabelle 22: NF/mm² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Gravidität.

	Kontrollgruppe				Adenomyose-Gruppe			
	Nulligravida		Gravida		Nulligravida		Gravida	
MM	S100	6,60±1,52	S100	3,93±2,64	S100	4,40±2,07	S100	3,91±3,09
	PGP9.5	4,00±1,22	PGP9.5	2,43±1,45	PGP9.5	2,60±0,89	PGP9.5	2,17±1,25
	p75	6,00±0,71	p75	2,93±2,02	p75	3,00±2,92	p75	2,97±2,15
	TrkA	1,00±0,71	TrkA	1,42±1,16	TrkA	1,40±0,55	TrkA	1,38±0,82
JZ	S100	3,30±2,61	S100	0,88±1,07	S100	1,13±1,31	S100	0,39±0,50
	PGP9.5	0,40±0,65	PGP9.5	0,12±0,30	PGP9.5	0,13±0,25	PGP9.5	0,07±0,22
	p75	2,00±1,27	p75	0,42±0,73	p75	1,83±2,31	p75	0,62±1,47
	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,09±0,30	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,07±0,26

3.1.10.4 Nervenfaserdichte in Bezug auf die Parität

Es wurde auch der Einfluss der Geburtenanzahl auf die Nervenfaserdichte betrachtet. Hierbei wurden die Frauen in Nulli- und Multipara unterteilt.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Frauen der Kontrollgruppe ohne Kinder in allen Färbungen die höchste Nervenfaserdichte aufwiesen. Die S100-positiven NF der Nullipara der Ko-G zeigten im MM (5,44±2,19) und der JZ (2,50±2,24) eine signifikant erhöhte Dichte im Vergleich zu den Nullipara der AM-G (MM: 3,09±2,12, JZ: 0,67±0,97), ($p < 0,05$); in der p75^{NTR}-Expression zeigte sich hier eine Tendenz ($p=0,0635$) (s. Abb. 12). Für die TrkA- und PGP9.5-positiven NF ließen sich keine signifikanten Unterschiede eruieren ($p > 0,05$, s. Abb. 12).

Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich in der Junktionalzone der Multipara (0,20±0,48) eine signifikant reduzierte Expression der p75^{NTR}-positiven NF im Vergleich mit den Nullipara (1,69±1,19), ($p < 0,01$, Abb. 12). In der TrkA-, S100- und PGP9.5-Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der NF-Dichte zwischen Multi- und Nullipara der Ko-G.

Innerhalb der Adenomyose-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Multi- und Nullipara festgestellt ($p > 0,05$; s. Abb. 12).

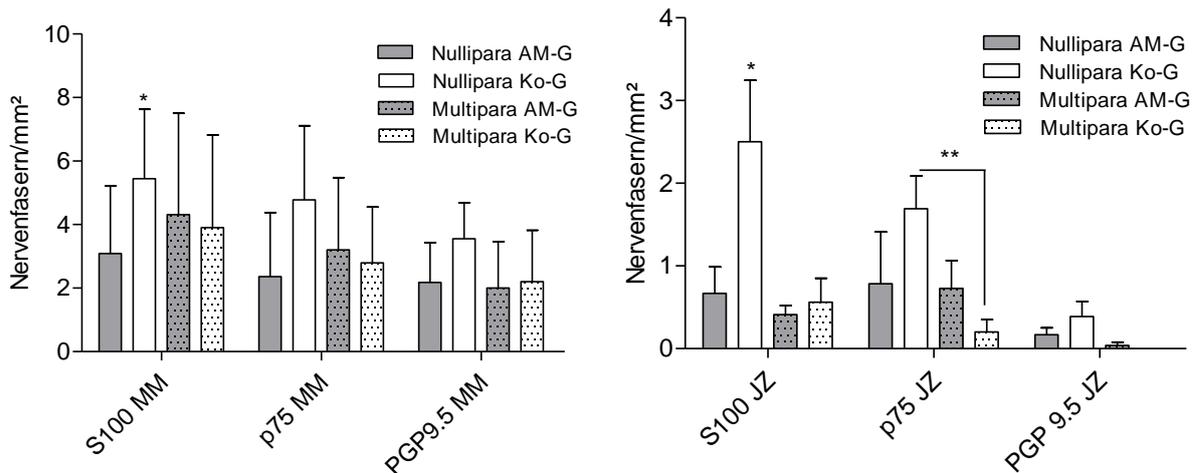


Abbildung 12: NF/mm² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G in den Färbungen gegen S100, PGP9.5 und p75^{NTR}, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Parität. Nullipara AM-G (n=12), Nullipara Ko-G (n=9), Multipara AM-G (n=28), Multipara Ko-G (n=10); *p < 0,05, **p < 0,01.

3.1.10.5 Nervenfaserdichte in Bezug auf die Schmerzanamnese

Auch ein möglicher Einfluss von Schmerzen auf die Nervenfaserdichte sollte erfasst werden. Zum einen wurden die Frauen der AM-G und Ko-G in eine Gruppe mit und ohne Schmerzen unterteilt und miteinander verglichen. Zum anderen wurde die Schmerz-Gruppe der AM-G weiter unterteilt in die Kategorien Dysmenorrhoe, Unterbauchschmerzen und beide Schmerzbilder gemeinsam. In der PGP9.5-, p75^{NTR}- und TrkA- Expression konnte keine Korrelation zwischen der Nervenfaserdichte und der Schmerzpathogenese festgestellt werden (p > 0,05, s. Tab. 23).

In der S100-Expression konnte in der Junctionalzone der Gruppe ohne Schmerzen eine signifikant erniedrigte Nervenfaserdichte der AM-G im Vergleich zur Ko-G beobachtet werden (p < 0,05; s. Abb. 13). Im Myometrium sieht man hierfür eine Tendenz (p=0,0623, s. Tab. 23).

Tabelle 23: NF/mm² im MM und der JZ der Ko-G und AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Schmerzpathogenese, *p < 0,05 im Vergleich von Ko-G und AM-G.

	Kontrollgruppe		Adenomyose-Gruppe	
	Keine Schmerzen	Schmerzen	Keine Schmerzen	Schmerzen
MM	S100	5,50±2,68	S100	3,43±2,71
	PGP9.5	3,00±1,41	PGP9.5	2,37±1,26
	p75	3,50±2,07	p75	2,30±1,74
	TrkA	1,00±0,50	TrkA	1,41±0,85
JZ	S100	2,00±2,03*	S100	0,35±0,40
	PGP9.5	0,35±0,53	PGP9.5	0,09±0,25
	p75	1,06±1,21	p75	0,75±1,50
	TrkA	0,11±0,33	TrkA	0,00±0,00

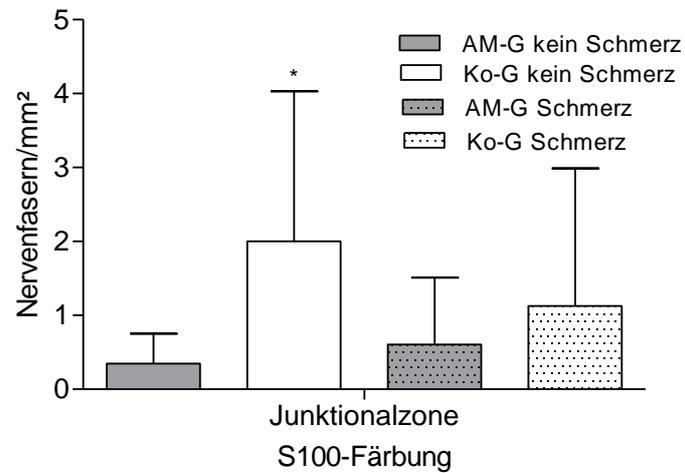


Abbildung 13: NF/mm² in der JZ der Ko-G und AM-G in der S100-Färbung, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Schmerzpathogenese. *p < 0,05.

Für die Expression aller neuronalen Marker sah man im MM und der JZ keine signifikanten Unterschiede in der NF-Dichte zwischen den verschiedenen Schmerzqualitäten der AM-G (p > 0,05; s. Tab. 24).

Tabelle 24: NF/mm² im MM und der JZ der AM-G, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, unterteilt nach Dysmenorrhoe, Unterbauchschmerzen und Dysmenorrhoe mit Unterbauchschmerzen.

	Adenomyose-Gruppe					
	Dysmenorrhoe		Unterbauchschmerzen		DM & US	
MM	S100	4,86±2,91	S100	4,71±4,27	S100	4,00±1,41
	PGP9.5	2,71±0,76	PGP9.5	2,86±1,35	PGP9.5	1,50±1,00
	p75	4,14±2,12	p75	3,71±2,69	p75	3,00±3,37
	TrkA	1,29±0,49	TrkA	1,29±0,00	TrkA	1,25±0,50
JZ	S100	0,60±0,42	S100	0,50±0,87	S100	1,00±1,73
	PGP9.5	0,00±0,00	PGP9.5	0,10±0,22	PGP9.5	0,00±0,00
	p75	0,25±0,29	p75	1,38±2,75	p75	0,00±0,00
	TrkA	0,29±0,49	TrkA	0,00±0,00	TrkA	0,33±0,58

3.1.10.6 Nervenfaserdichte bei Frauen mit AM und EM

Bei Frauen mit Adenomyose wird häufig eine Koinzidenz mit der Endometriose beobachtet (7). Dadurch fällt es schwer bestimmte Symptome klar der einen oder der anderen Erkrankung zuzuordnen. Um ausschließen zu können, dass diejenigen Frauen der Adenomyose-Gruppe mit einer erhöhten Nervenfaserdichte eine Koinzidenz mit Endometriose haben, wurde die AM-G in eine Gruppe ohne Endometriose und eine Gruppe mit Endometriose unterteilt. Die Gruppe der Frauen mit AM und Endometriose wurde erneut gegen die AM-G und Ko-G verglichen. Hierbei zeigten sich für S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA keine signifikanten Unterschiede in der Nervenfaserdichte ($p > 0,05$; s. Tab. 25).

Tabelle 25: NF/mm² im MM und in der JZ der Ko-G und der AM-G ohne Endometriose und mit Endometriose, dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung.

	Kontrollgruppe	Adenomyose-Gruppe		
	(n=19)	ohne Endometriose (n=34)	mit Endometriose (n=8)	
MM	S100	4,63±2,65	S100 4,15±3,17	S100 2,75±1,04
	PGP9.5	2,84±1,54	PGP9.5 2,12±1,30	PGP9.5 2,00±1,41
	p75	3,74±2,23	p75 2,79±2,00	p75 3,25±3,06
	TrkA	1,29±1,05	TrkA 1,36±0,82	TrkA 1,38±0,52
JZ	S100	1,59±1,95	S100 0,48±0,69	S100 0,33±0,52
	PGP9.5	0,19±0,42	PGP9.5 0,07±0,22	PGP9.5 0,08±0,20
	p75	0,86±1,14	p75 0,61±1,42	p75 1,50±2,60
	TrkA	0,07±0,26	TrkA 0,04±0,19	TrkA 0,33±0,52

3.1.11 Korrelation zwischen Neurotrophin-Expression und NF-Dichte

Es sollte analysiert werden, ob die Expression der Neurotrophine mit der Dichte der Nervenfasern korreliert. Hierzu wurden die Expressionen von NT-3 und NGF jeder Patientin mit der Darstellung der Nervenfasern durch die neuronalen Marker S100- und PGP9.5 verglichen. Es wurde besonders auf die Stellen mit besonders hoher NF-Dichte geachtet und mit den gleichen Serienschnitten der Neurotrophinfärbungen verglichen. Zusammenhänge zwischen einer starken NGF- und NT-3 Expression und einer vermehrten Nervenfaserdichte in der S100- und der PGP9.5-Färbung konnte in keiner der Schichten durch einen Vergleich der gleichen Präparate in den verschiedenen Anfärbungen aufgezeigt werden (s. Abb. 14).

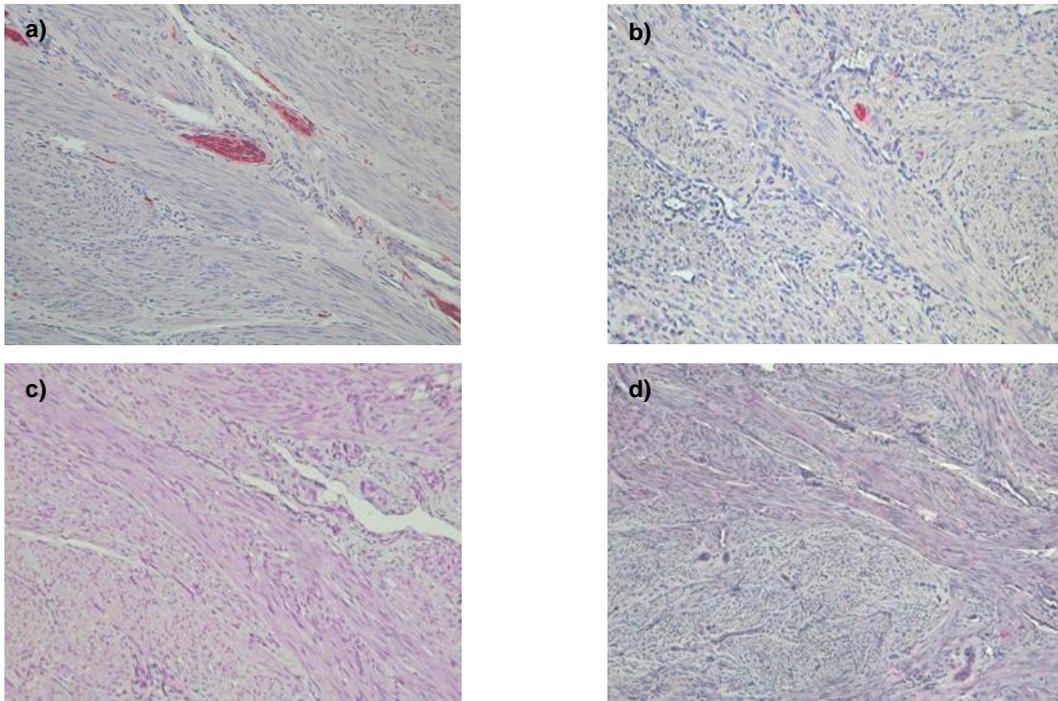


Abbildung 14: Immunhistochemische Darstellung des MM einer Patientin der Ko-G in den Färbungen gegen **a)** S100, **b)** PGP9.5, **c)** NGF, **d)** NT-3; Vergrößerung x200.

3.2 Neurotrophe Eigenschaften der AM

3.2.1 Nervenfaseraussprossung beim NWA

Um die Ergebnisse der Immunhistochemie zu verifizieren, sollte im Rahmen eines NWA auch ein Vergleich des Gehalts an Neurotrophinen in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit und ohne AM stattfinden. Hierzu wurden im NWA sensible Hinterwurzelganglien in den Peritonealflüssigkeiten von Frauen beider Gruppen inkubiert und anschließend das Neuritenwachstum analysiert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Neuritenaussprossung der AM-G und Ko-G ($p > 0,05$; s. Abb. 15, 16). Im Vergleich zur Negativkontrolle war die Aussprossung der Positivkontrolle, der AM-G und der Ko-G signifikant höher ($p < 0,01$; s. Abb. 16). Die Aussprossung der Kontrollgruppe und der Adenomyose-Gruppe war im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant geringer ($p < 0,05$; s. Abb. 16).

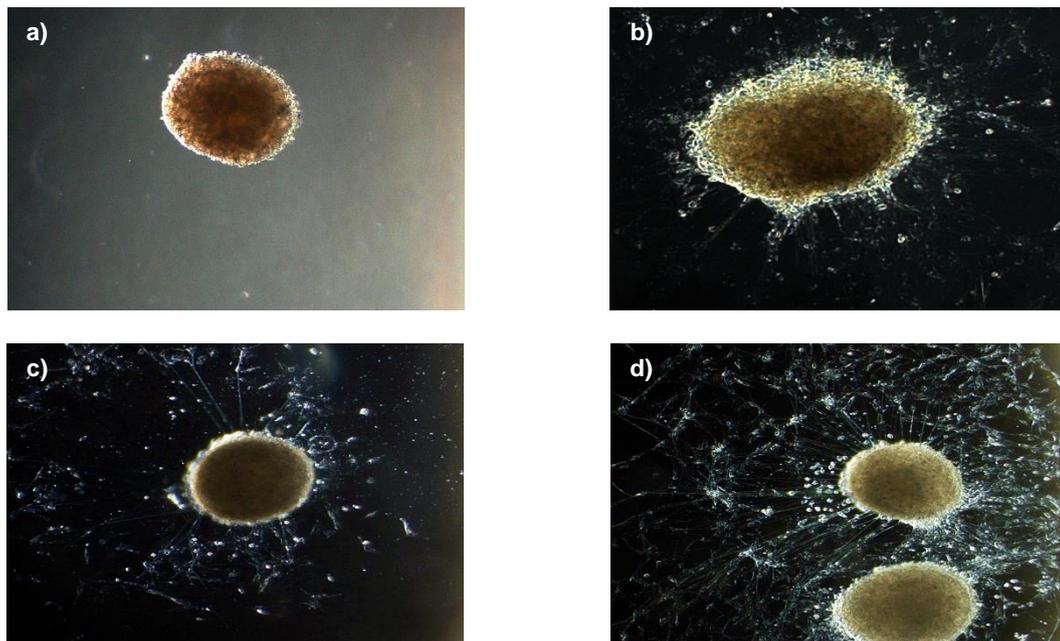


Abbildung 15: Ganglien in verschiedenen Medien, Vergrößerung x200. **a)** Negativkontrolle in DMEM, Neuronaler Wachstums-Score (NWS) = 0, **b)** Ganglion in der PF einer Frau ohne AM mit dem NWS von 1, **c)** Ganglion in der PF einer Frau mit AM mit dem NWS von 2, **d)** Positivkontrolle mit 0,1 ng/ml NGF mit dem NWS von 3.

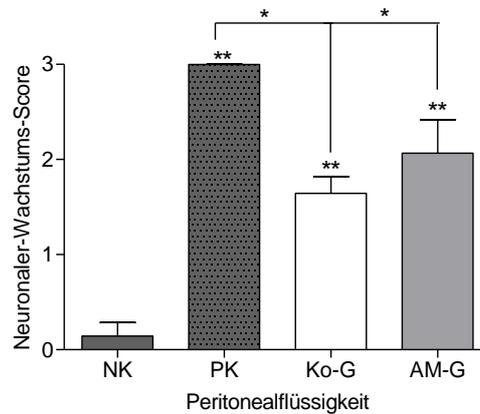


Abbildung 16: Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung des Neuronalen-Wachstums-Scores der Ganglien, inkubiert in den Peritonealflüssigkeiten von Frauen mit und ohne AM. NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.2.2 Differenzierung der neu ausgesprossenen Nerven im NWA

Zur weiteren Charakterisierung der NF wurden drei verschiedene Färbungen vorgenommen. Zum Nachweis von myelinisierten NF wurden hierzu Marker gegen S100 und Neurofilament und zum Nachweis von Nervenfasern, die den $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptor exprimieren, wurde der Marker gegen $p75^{\text{NTR}}$ verwendet. Um nachzuweisen, dass die Neuriten auch neu ausgesprossen sind, wurde ebenso mit dem Marker für GAP 43 gefärbt. Alle gefärbten Ganglien zeigten sich positiv für die Marker S100, NF und $p75^{\text{NTR}}$. Ebenso bestätigte sich durch die positive Reaktion der Neuriten auf Gap 43, dass es sich bei den analysierten Neuriten um neu gewachsene handelt (s. Abb. 17).

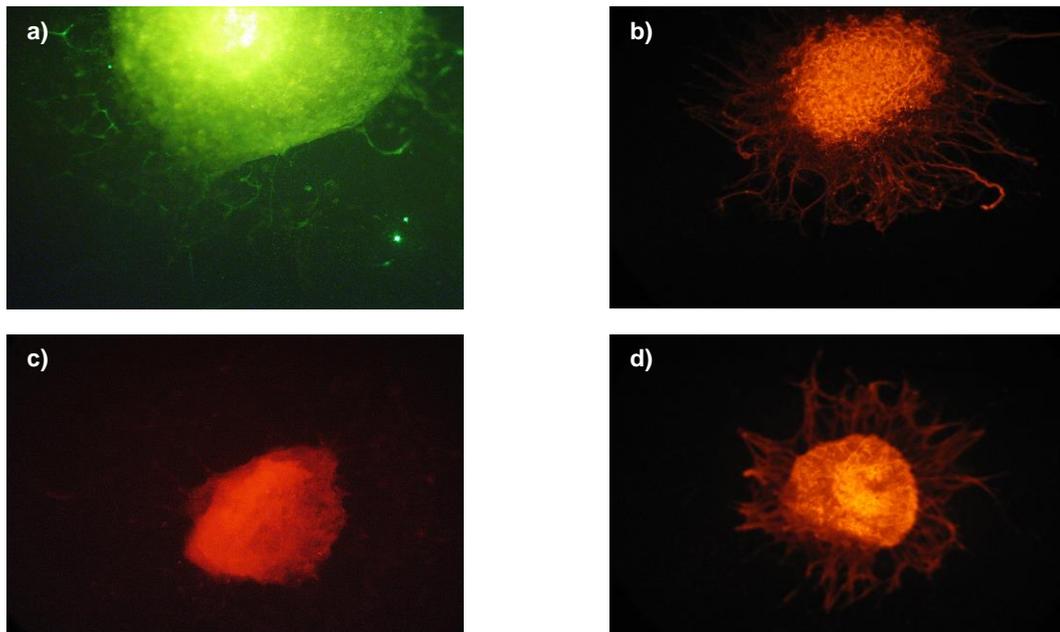


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbungen der Ganglien; Vergrößerung x200. **a)** Ganglion inkubiert in der PF einer Patientin der AM-G, gefärbt gegen S100, **b)** Ganglion einer Patientin der AM-G, gefärbt gegen NF, **c)** Ganglion einer Patientin der AM-G, gefärbt gegen p75^{NTR}, **d)** Ganglion einer Patientin der AM-G, gefärbt gegen GAP 43.

4 Diskussion

Hier werden erstmals systematische Expressionsanalysen uteriner Neurotrophine NGF und NT-3 in der Adenomyose dargestellt sowie eine mögliche Korrelation zwischen der Innervation der Adenomyose und der Neurotrophin-Expression untersucht. Die Innervation wurde mittels Immunhistochemie gegen S100, PGP9.5, p75^{NTR} und TrkA untersucht.

Das Endometrium von Frauen sowohl mit AM, als auch ohne, ist kaum innerviert. Nur im Bereich der Endometrium-Myometrium-Grenze (der Junktionalzone) von gesunden Frauen finden sich S100-positive Nervenfasern ($1,4 \pm 1,9$ NF/mm²); bei den Frauen mit Adenomyose zeigten sich aber weniger NF ($0,5 \pm 0,7$ NF/mm²). Auch Quinn spricht vom Vorkommen von PGP9.5-positiven NF in der JZ gesunder Frauen, während die Innervation in der JZ bei Frauen mit AM fehlt (33). Quinn postuliert hier einen möglichen Zusammenhang der Pathogenese der AM, die unter anderem in der Aufhebung der Endometrium-Myometrium-Grenze liegt und durch die AM-Herde zu einer Auflockerung des Myometriums führt, und in der geringeren Innervation aufgrund der Zerstörung der Gewebestruktur (33).

Darüber hinaus ist bekannt, dass der Östrogenspiegel die uterine Innervation beeinflusst. Die Arbeitsgruppe Smith et al. hat in den Uteri gesunder Ratten bei hohem Östrogenspiegel eine Verminderung sympathischer Nerven und bei niedrigem Östrogenspiegel eine Reinnervation beobachten können (25). Da die Adenomyose eine Östrogen-abhängige Erkrankung ist, in der konstant erhöhte Östrogenspiegel vorliegen (20, 21), könnte dies zusätzlich die verminderte NF-Dichte der Frauen der AM-G im Vergleich zu gesunden Frauen erklären.

Die S100-positiven NF in der JZ der Frauen der Ko-G konnten besonders in der Nähe von Gefäßen beobachtet werden, während dieser lokale Zusammenhang für die NF der AM-G nicht sichtbar war. Auch die Gruppe Smith et al. beschreiben das Vorkommen von NF in der JZ im Zusammenhang mit Gefäßen; ebenso wurde in einer Publikation von Haase et al. in Nagetier-Uteri eine Assoziation von Innervation und Gefäßen beschrieben (25, 26). In ihrer Studie hat die Arbeitsgruppe die NF-Expression von nicht-schwangeren und schwangeren Ratten nach der Entbindung analysiert und festgestellt, dass während der Schwangerschaft eine Denervierung stattfindet, die bereits zwei

Stunden nach der Entbindung durch eine Reinnervation aufgehoben wird. Hierbei sah man auch bei den neu eingesprossenen Nervenfasern einen lokalen Bezug zu Gefäßen (26). Dies könnte darauf hindeuten, dass bei den Frauen mit AM das uterine Remodelling in Form einer Reinnervation gestört ist, da es keine simultane Neovaskularisierung hervorruft, sondern die NF diffus einwachsen (33).

Die Gruppe Lin et al. (2009) beschreibt im Stratum Functionale von Frauen mit Endometriose, Adenomyose oder Leiomyomen mit einer positiven Schmerzsymptomatik das Vorkommen von PGP9.5-positiven Nervenfasern, im Vergleich zu Frauen mit denselben Krankheitsbildern ohne Schmerzen (55). Jedoch ist die Aussagekraft dieser Studie durch die geringe NF-Dichte von 0,5 NF/mm² in der Gruppe der Frauen mit Adenomyose eingeschränkt. Im Gegensatz hierzu postulieren Fraser et al. (2009) die Möglichkeit der nicht-invasiven Endometriose-Diagnostik mittels Biopsie des uterinen Endometriums. In einer Studie haben sie nur im Stratum Functionale der Frauen mit Endometriose NF beobachtet, während diese nicht bei Frauen mit Adenomyose, Leiomyomen oder Endometriumpolypen gesehen werden konnten (56). Diese Daten konnten in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Im SF des Endometriums konnte in keiner der Gruppen eine Innervation nachgewiesen werden - weder bei den Frauen der Ko-G, noch bei den Frauen mit Adenomyose oder Adenomyose und Endometriose. Ebenso ließ sich keine vermehrte Innervation bei Frauen mit Schmerzen beobachten. Im Gegenteil ließen sich im MM der gesunden Frauen ohne Schmerzen tendenziell mehr S100-positive NF sehen, als bei den Frauen ohne Schmerzen der AM-G. In einem Nachwort zu einer Studie von Quinn et al. wird die These formuliert, dass die Schmerzen von Frauen mit AM vielmehr in der abnormen Reinnervation begründet liegen als in einer vermehrten Innervation an sich. Somit wäre die fehlende Korrelation zwischen der NF-Dichte und dem Vorkommen von Schmerzen erklärbar, denn die Entstehung von Schmerzen könnte ebenso an mechanischen oder neuralen Stimuli zwischen dem AM-Gewebe und den Nerven liegen, die es in Zukunft weiter zu untersuchen gilt (57).

In Bezug auf die Hormoneinnahme der Frauen konnte in dieser Arbeit in der Ko-G ein Trend zu einer verminderten NF-Dichte im MM der Frauen unter Hormontherapie gedeutet werden, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant. Dabei spielte es keine Rolle, ob orale Kontrazeptiva oder GnRH-Analoga in Kombination eingenommen

wurden. Auch die Gruppe Smith et al. berichten in gesunden Ratten von einer verminderten NF-Dichte in allen uterinen Schichten während des *estrus*, der Zeit des höchsten Östrogenspiegels während des Zyklus weiblicher Säugetiere, im Vergleich zu allen anderen Zyklusabschnitten (25). Sie vermuten hinter diesem Prozess eher eine zyklusabhängige Östrogen-bedingte Degeneration als eine Retraktion der Nervenfasern und knüpfen an die These der Degeneration von NF während der Schwangerschaft an (25). Auch die Arbeitsgruppe Fraser et al. hat in ihren Studien im Endometrium von Frauen mit EM unter Hormonbehandlung im Vergleich zu Frauen mit unbehandelter EM eine erniedrigte Expression von NGF und dem unspezifischen Rezeptor p75^{NTR} gesehen (32). Jedoch wurden in dieser Studie lediglich Frauen mit Endometriose betrachtet, ohne ebenso eine gesunder Kontrollgruppe zu analysieren. Daher lässt sich nicht sagen, ob NGF tatsächlich im Endometrium von Frauen mit Endometriose überexprimiert ist.

Wie oben dargestellt, wurde in der Publikation von Haase et al. eine verminderte NF-Dichte in allen uterinen Schichten während der Schwangerschaft und eine darauffolgende Dichteerhöhung der NF, aufgrund einer axonalen Neuaussprossung, nach der Entbindung, in Nagetier-Uteri beschrieben (26). Ebenfalls von einer veränderten Innervation der Multipara sprechen Quinn et al. und begründen dies erneut mit dem traumatischen Effekt von Entbindungen und der daraus resultierenden Zerstörung der Endometrium-Myometrium-Grenze und der geordneten Innervation (58). Auch die Studie von Varol et al. berichtet von einer Denervierung der Uteri von schwangeren Ratten (59).

In dieser Arbeit konnte im MM der Multigravida der Ko-G, im Vergleich zu den Nulligravida, eine tendenziell verminderte Expression S100-, PGP9.5- und p75^{NTR}-positiver NF dargestellt werden. Ferner konnte auch im MM und der JZ der Multipara der Ko-G, im Vergleich mit den Nullipara, eine tendenziell verminderte Innervation durch S100-, PGP.5- und p75^{NTR}-positive NF demonstriert werden. Im Vergleich mit den Nullipara der AM-G ließen sich im MM und der JZ der Nullipara der Ko-G signifikant mehr S100-positive NF aufweisen; in der p75^{NTR}-Expression zeigte sich eine Tendenz. Zwischen der Gruppe der Multigravida und Nulligravida und Multipara und Nullipara der AM-G gab es keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse deuten erneut auf eine lokale Überexpression von Östrogen im Uterus von Frauen mit Adenomyose hin.

Durch die fehlende Schwankung des Östrogenlevels entfällt vor allem die Reinnervation des Uterus aufgrund des ausbeibenden Östrogenabfalls.

S100-, PGP9.5-, p75^{NTR} – und TrkA-positive NF ließen sich sowohl im MM der AM-G, als auch der Ko-G, darstellen. In beiden Gruppen waren, im Vergleich zu S100- und p75^{NTR}-positiven NF, insgesamt weniger PGP9.5-positive NF im MM darstellbar, da PGP9.5 einen Marker für intakte afferente und efferente Nervenfasern darstellt (25, 60). Insgesamt zeigten sich im MM der AM-G tendenziell weniger S100-, PGP9.5-, p75^{NTR} – positive NF, als in der Ko-G.

In den Adenomyose-Herden konnten keine Nervenfasern nachgewiesen werden. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen von Quinn (2007), der ebenfalls keine NF in den Adenomyose-Läsionen darstellen konnte (33). Dies könnte in der traumatischen Pathogenese der Adenomyose begründet sein, da die Zerstörung der Endometrium-Myometrium-Grenze zu einer Invasion von endometrialem Gewebe ins MM führt, die wiederum die geordnete Uterusstruktur und Innervation zerstört (23, 33).

Die Ergebnisse der IHC-Analyse der NGF- und NT-3-Expression im uterinen Gewebe von Frauen der AM-G lassen vermuten, dass Neurotrophine in der Pathogenese der Adenomyose keine Rolle spielen. Die Expression von NGF, NT-3 sowie deren Rezeptoren p75^{NTR} und TrkA sind weder im Endometrium, noch im Myometrium oder den AM-Herden von Frauen mit AM oder AM und Endometriose erhöht im Vergleich zu den Werten der Frauen der Kontrollgruppe. Wie in der Publikation von Chalar et al. konnte auch in dieser IHC-Analyse eine stärkere Expression beider Rezeptoren im Myometrium, verglichen mit den Stromazellen des Endometriums, beobachtet werden (38). Zudem sah man im MM beider Gruppen eine stärkere Expression von p75^{NTR}-positivem Gewebe, im Vergleich mit der für den TrkA-Rezeptor. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass der Rezeptor p75^{NTR} für alle vier Vertreter der Neurotrophine sensibel ist und somit verstärkt exprimiert wird, während der Rezeptor TrkA lediglich eine Affinität für NGF aufweist (42).

In mehreren Studien wurde die Überexpression von NGF und NT-3 sowie in peritonealen Endometrioseläsionen (39, 40, 61), als auch in der Peritonealflüssigkeit von Frauen mit Endometriose dargestellt (52, 62). Jedoch konnte die Arbeitsgruppe Mechsner et al. (2012) in einer Studie darstellen, dass in Uterusspülungen und Lysaten von Endometriumgewebe keine Unterschiede in der NGF-Expression zwischen Frauen

mit und ohne Endometriose vorlagen (63). Des Weiteren konnten sie demonstrieren, dass das Kulturmedium von primären Zellkulturen aus Endometriumzellen von Frauen mit EM keine Aussprossung sensibler Ganglien hervorruft (63). Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnten auch Borghese et al. eine signifikant erhöhte NGF -, NT-3-, NT-4/5 - und BDNF - Expression in ektopen Endometrium von Frauen mit EM im Vergleich zu deren eutopen Endometrium zeigen (64). Daher muss von der Möglichkeit ausgegangen werden, dass eine vermehrte Synthese von Nervenwachstumsfaktoren bei Frauen mit Endometriose direkt von peritonealen Läsionen ausgeht (62, 63). Auch in dieser Arbeit konnten keine Unterschiede in der NGF-Expression im Endometrium von Frauen mit AM und EM im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Ebenso wie in der Studie von Cowen et al. (1996) konnte auch in dieser IHC-Analyse im Vergleich der immunhistochemischen Ergebnisse der Expression von Nerven mit der des Neurotrophins NGF keine Korrelation erkannt werden (65). Einige Studien haben bereits einen fehlenden Zusammenhang von einer vermehrten NGF-Expression und einer zugleich erhöhten NF-Dichte unter dem Einfluss von Östrogen beschrieben (41, 66, 67). Ein Experiment von Chavez et al. konnte beweisen, dass im Nagetier-Uterus nach einer Ovariectomie eine Vermehrung von sympathischen NF zu verzeichnen ist und dass diese sich nach Östrogengabe reduziert. Zudem haben sie ein verringertes NGF-Level bei den Ratten nach Ovariectomie registriert, welches nach Östrogengabe gestiegen ist (66). Auch die Gruppe Smith et al. konnte einen Anstieg von NGF im Endometrium von ovariectomierten Ratten nach einer Östrogengabe demonstrieren und schließt daraus, dass der Grund für die Östrogen-induzierte Verringerung der Nervenfaserdichte nicht in einer Erniedrigung des Neurotrophins NGF liegt und somit keine Korrelation zwischen dem Gehalt an NGF und der NF-Dichte zu sehen ist (41).

In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der NGF-Expression zwischen der AM-G und der Ko-G beobachtet werden. Da Östrogen neben der NGF- auch die BDNF - Expression im Uterus stimuliert (41) und BDNF die sympathische Neurogenese inhibieren kann (68), ließe sich hier eine der Ursachen für die Denervierung unter Östrogeneinfluss vermuten, jedoch gilt es dies weiter zu untersuchen.

Im Vergleich der verschiedenen Zyklusphasen der Frauen innerhalb der Gruppen, konnten, wie bei Barcena de Arellano et al., keine Unterschiede evaluiert werden (63). In einer weiteren Publikation von Barcena de Arellano et al. konnte die NGF-Expression

in den Peritonealfüssigkeiten von Frauen mit und ohne EM dargestellt werden, die unabhängig von der Schmerzintensität war (69). Ebenso konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang eines Schmerzvorkommens mit einer erhöhten Neurotrophin-Expression verzeichnet werden.

Einhergehend mit den Ergebnissen der IHC-Analyse der Neurotrophine konnte im neuronalen Wachstums-Assay kein Unterschied in der Neuritenaussprossung zwischen den Ganglien, die in der Peritonealfüssigkeit von Frauen mit und ohne AM inkubiert wurden, beobachtet werden. Auch Barcena de Arellano et al. konnte zwischen der Neuritenaussprossung induziert durch die PF von Frauen mit AM und gesunden Frauen keine Unterschiede eruieren (70). Im Vergleich zur Positivkontrolle ist die Neuriten-Aussprossung in beiden Gruppen signifikant geringer. Dieses Ergebnis stützt die oben genannte These, dass nicht das Endometrium, sondern vielmehr ektoper peritonealer Endometriose-Läsionen neurotrophe Eigenschaften besitzen (62).

Jedoch ist eine signifikant höhere Neuritenaussprossung beider Gruppen im Vergleich mit der Negativkontrolle zu sehen, was bedeutet, dass sich in geringen Maßen Substanzen in der PF der Frauen mit und ohne AM befinden, die das Nervenwachstum stimulieren. Erklären lässt sich dies dadurch, dass die Frauen der Kontrollgruppe gutartige gynäkologische Erkrankungen, wie z. B. Uterusmyome, hatten und 63 % der Frauen zudem Schmerzen angaben (52). Die verschiedenen Färbungen zur weiteren Differenzierung der Nervenfasern ergaben unter anderem durch die Expression von GAP 43, dass es sich um neu ausgesprossene NF handelt.

In dieser Arbeit konnte eine tendenziell verringerte NF-Dichte im MM von Frauen der AM-G im Vergleich mit den Frauen der Ko-G beobachtet werden. Dies könnte durch die lokale Überexpression von Östrogen begründet sein (21). In der Kontrollgruppe konnten diese Östrogen-abhängigen Schwankungen der NF-Dichte demonstriert werden: Multigravida und Multipara, die ein- oder mehrmals erhöhten Östrogenspiegeln unterlagen, zeigten eine verringerte Dichte an NF im Vergleich zu den Nullipara und Nulligravida. In der Gruppe der Frauen mit Adenomyose hingegen, waren diese Unterschiede im Vergleich zwischen Nulli- und Multiparität sowie Nulli- und Multigravidität nicht vorhanden, da durch die konstant erhöhten Östrogenspiegel in diesem Krankheitsbild die natürlichen Hormonschwankungen entfallen und somit auch

die Variabilität in der Anzahl der NF. Die NF-Dichte von Frauen der AM-G entspricht daher in etwa der von gesunden Schwangeren.

In dieser Arbeit konnten keine Unterschiede in der Expression von NGF und NT-3 im Vergleich von Frauen mit und ohne AM festgestellt werden.

Um die Östrogen-induzierte Denervierung in Zukunft besser verstehen zu können, müssen unter anderem die Zusammenhänge zwischen dieser Östrogen-abhängigen Erkrankung und der Auswirkung des Östrogens auf weitere Neurotrophine, z.B. BDNF, deren Rezeptoren und der Signalverarbeitung auf Nervenzellebene analysiert werden.

Arnold et al. konnte in peritonealen Läsionen von Frauen mit Endometriose ein Ungleichgewicht zwischen sensorischen und sympathischen NF aufzeigen (61), wobei sich das Verhältnis zugunsten der sensorischen NF hin verschob und hierin eine mögliche Ursache für die Schmerzpathogenese der Frauen mit EM vermutet wird. Daher scheint es sinnvoll auch für die Frauen mit AM eine weitere Analyse der Innervation mit anderen neuronalen Markern zu veranlassen, sodass eine Differenzierung in cholinerge, adrenerge und sensorische NF erfolgen kann.

Da in dieser Arbeit keine quantitative Erhöhung der NF-Dichte im Uterus von Frauen mit AM im Vergleich zu gesunden Frauen dargestellt werden konnte, sollte in weiteren Studien die Möglichkeit einer qualitativen Veränderung und Sensibilisierung von NF bei an AM erkrankten Frauen untersucht werden. Mögliche Ansätze wären hier die Messung von Schmerztransmittern im Menstruationsblut.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in der Analyse der Expression der Neurotrophine NGF und NT-3 im uterinen Gewebe mit Adenomyose und der Korrelation dieser mit der Innervation des Uterus von Frauen mit AM durch S100-, PGP9.5-, TrkA- und p75^{NTR}-positiven NF. Hierfür wurden 42 Uterusschnitte von Frauen mit Adenomyose und 19 Uterusschnitte von Frauen einer Kontrollgruppe immunhistochemisch gegen S100, PGP9.5-, TrkA- und p75^{NTR} sowie NGF und NT-3 gefärbt. Es zeigten sich im Vergleich der AM-G und Ko-G weder im MM, noch im Endometrium signifikante Unterschiede in der Expression von NGF, NT-3, TrkA- und p75^{NTR}. Im Vergleich der Nervenfaserdichte beider Gruppen untereinander gab es keine signifikanten Unterschiede, jedoch zeigte sich eine tendenziell verminderte S100-, PGP9.5-, TrkA- und p75^{NTR}-Expression im MM der AM-G im Vergleich mit dem MM der Frauen der Ko-G.

Zusätzlich wurde in einem neuronalen Wachstums-Assay die Peritonealflüssigkeit von Frauen beider Gruppen auf neurotrophe Eigenschaften untersucht. Hier zeigten sich keine Unterschiede in der Aussprossung sensibler Ganglien nach Inkubation in den Peritonealflüssigkeiten der Frauen mit und ohne AM.

Diese Ergebnisse deuten an, dass die endometriale und uterine Neurotrophineexpression und die endometriale Innervation in der Adenomyose im Vergleich zu gesunden Frauen nicht verändert ist, wobei die Tendenz zu einer eher verminderten uterinen Innervation bei Frauen mit Adenomyose besteht. Dies lässt das Vorkommen einer De- und Reinnervation in der Ätiologie des Krankheitsbildes vermuten, bei der Östrogen eine große Rolle spielt.

Obwohl die Adenomyose, als Endometriosis genitalis interna, als eine Form der Endometriose betrachtet wird, weist sie ein deutlich abweichendes Innervationsmuster auf.

6 Literaturverzeichnis

1. Bird C, McElin T, Manalo-Estrella P. The elusive adenomyosis of the uterus-revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 1972;112(5).
2. Levgur M. Therapeutic options for adenomyosis: a review. *Arch Gynecol Obstet.* 2007;276(1):1-15.
3. Agati L, Renzi M, Sciomer S, et al. Transesophageal dipyridamole echocardiography for diagnosis of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19(4):765-70.
4. Fedele L, Bianchi S, Dorta M, et al. Transvaginal ultrasonography in the diagnosis of diffuse adenomyosis. *Fertil Steril.* 1992;58(1):94-7.
5. Benagiano G, Brosens I. History of adenomyosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2006;20(4).
6. Tariverdian N, Theoharides TC, Siedentopf F, et al. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Semin Immunopathol.* 2007;29(2):193-210.
7. Leyendecker G, Kunz G. [Endometriosis and adenomyosis]. *Zentralbl Gynakol.* 2005;127(5):288-94.
8. Bergeron C, Amant F, Ferenczy A. Pathology and physiopathology of adenomyosis. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.* 2006;20(4).
9. Kunz G, Beil D, Huppert P, et al. Adenomyosis in endometriosis--prevalence and impact on fertility. Evidence from magnetic resonance imaging. *Hum Reprod.* 2005;20(8):2309-16.
10. Mathur BB, Shah BS, Bhende YM. Adenomyosis uteri. A pathologic study of 290 cases. *Am J Obstet Gynecol.* 1962;84:1820-9.
11. Mechsner S, Bartley J, Halis G, et al. [Endometrial carcinoma using GnRH analogues therapy in endometriosis]. *Zentralbl Gynakol.* 2002;124(10):478-81.
12. Azziz R. Adenomyosis: current perspectives. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1989;16(1):221-35.

13. Ferenczy A. Pathophysiology of adenomyosis. *Hum Reprod Update*. 1998;4(4):312-22.
14. Siegler AM, Camilien L. Adenomyosis. *J Reprod Med*. 1994;39(11):841-53.
15. Atzori E, Tronci C, Sionis L. Transvaginal ultrasound in the diagnosis of diffuse adenomyosis. *Gynecol Obstet Invest*. 1996;42(1):39-41.
16. Kepkep K, Tuncay YA, Goynumer G, et al. Transvaginal sonography in the diagnosis of adenomyosis: which findings are most accurate? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;30(3):341-5.
17. Wu MH, Pan HA, Chang FM. Three-dimensional and power Doppler ultrasonography in infertility and reproductive endocrinology. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(3):209-14.
18. Keckstein J. Hysteroscopy and adenomyosis. *Contrib Gynecol Obstet*. 2000;20:41-50.
19. Bergholt T, Eriksen L, Berendt N, et al. Prevalence and risk factors of adenomyosis at hysterectomy. *Hum Reprod*. 2001;16(11):2418-21.
20. Zhang X, Lu B, Huang X, et al. Innervation of endometrium and myometrium in women with painful adenomyosis and uterine fibroids. *Fertil Steril*. 2010;94(2):730-7.
21. Kitawaki J. Adenomyosis: the pathophysiology of an oestrogen-dependent disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006;20(4):493-502.
22. Matalliotakis IM, Katsikis IK, Panidis DK. Adenomyosis: what is the impact on fertility? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17(3):261-4.
23. Leyendecker G, Wildt L, Mall G. The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;280(4):529-38.
24. Latini C, Frontini A, Morroni M, et al. Remodeling of uterine innervation. *Cell Tissue Res*. 2008;334(1):1-6.
25. Zoubina EV, Fan Q, Smith PG. Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *J Comp Neurol*. 1998;397(4):561-71.
26. Haase EB, Buchman J, Tietz AE, et al. Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell Tissue Res*. 1997;288(2):293-306.

27. Anaf V, Simon P, El Nakadi I, et al. Relationship between endometriotic foci and nerves in rectovaginal endometriotic nodules. *Hum Reprod.* 2000;15(8):1744-50.
28. Wikland M, Lindblom B, Dahlstrom A, et al. Structural and functional evidence for the denervation of human myometrium during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1984;64(4):503-9.
29. Tokushige N, Robert M, P R, et al. Different types of small nerve fibers in eutopic endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2007;88:795-803.
30. Al-Jefout M, Andreadis N, Tokushige N, et al. A pilot study to evaluate the relative efficacy of endometrial biopsy and full curettage in making a diagnosis of endometriosis by the detection of endometrial nerve fibers. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(6):578 e1-4.
31. Zhang X, Yao H, Huang X, et al. Nerve fibres in ovarian endometriotic lesions in women with ovarian endometriosis. *Hum Reprod.* 2010;25(2):392-7.
32. Tokushige N, Markham R, Russell P, et al. Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1589-98.
33. Quinn M. Uterine innervation in adenomyosis. *J Obstet Gynaecol.* 2007;27(3):287-91.
34. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987;237(4819):1154-62.
35. Li Y, Zhang S, Zou S, et al. Accumulation of nerve growth factor and its receptors in the uterus and dorsal root ganglia in a mouse model of adenomyosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9(30).
36. Casciaro A, Arcuri F, Occhini R, et al. Expression of Placental Neurotrophin-3 (NT-3) in Physiological Pregnancy, Preeclampsia and Chorioamnionitis. *Clin Med Pathol.* 2009;2:9-15.
37. Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 1991;14(5):165-70.
38. Chalar C, Richeri A, Viettro L, et al. Plasticity in developing rat uterine sensory nerves: the role of NGF and TrkA. *Cell Tissue Res.* 2003;314(2):191-205.

39. 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(7):1895-900.
40. 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;88(3):581-7.
41. Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W, et al. Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci.* 2003;18(10):2760-8.
42. Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(8):1061-6.
43. Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature.* 1991;350(6314):158-60.
44. Stucky CL, Koltzenburg M. The low-affinity neurotrophin receptor p75 regulates the function but not the selective survival of specific subpopulations of sensory neurons. *J Neurosci.* 1997;17(11):4398-405.
45. Tessarollo L, Tsoulfas P, Martin-Zanca D, et al. trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development.* 1993;118(2):463-75.
46. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell.* 1994;76(6):1001-11.
47. Ernfors P, Lee KF, Kucera J, et al. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell.* 1994;77(4):503-12.
48. Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J Neurosci.* 1993;13(5):2136-48.
49. Mendell LM, Albers KM, Davis BM. Neurotrophins, nociceptors, and pain. *Microsc Res Tech.* 1999;45(4-5):252-61.
50. Apfel SC. Neurotrophic factors and pain. *Clin J Pain.* 2000;16(2 Suppl):S7-11.

51. Cristofaro B, Stone OA, Caporali A, et al. Neurotrophin-3 is a novel angiogenic factor capable of therapeutic neovascularization in a mouse model of limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(6):1143-50.
52. Barcena de Arellano ML, Arnold J, Vercellino F, et al. Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions. *Fertil Steril.* 2011;95(3):1123-6.
53. Gary M.K . Tse, Philip C.W . Lui, Richard A. Scolyer, et al. Tumour Angiogenesis and p53 Protein Expression in Mammary Phyllodes Tumors. *Modern Pathol.* 2003;16(10).
54. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 1995;48(9):876-8.
55. Zhang X, Lu B, Huang X, et al. Endometrial nerve fibers in women with endometriosis, adenomyosis, and uterine fibroids. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1799-801.
56. Al-Jefout M, Dezarnaulds G, Cooper M, et al. Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study. *Hum Reprod.* 2009;24(12):3019-24.
57. Quinn MJ, Kirk N. Differences in uterine innervation at hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(6):1515-9; discussion 9-20.
58. Atwal G, du Plessis D, Armstrong G, et al. Uterine innervation after hysterectomy for chronic pelvic pain with, and without, endometriosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(5):1650-5.
59. Varol FG, Duchemin AM, Neff NH, et al. Nerve growth factor (NGF) and NGF mRNA change in rat uterus during pregnancy. *Neurosci Lett.* 2000;294(1):58-62.
60. Zoubina EV, Smith PG. Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle. *Auton Neurosci.* 2000;84(3):176-85.
61. Arnold J, Barcena de Arellano ML, Ruster C, et al. Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain Behav Immun.* 2012;26(1):132-41.
62. Barcena de Arellano ML, Wagner MF, Oldeweme J, et al. Neurotrophin expression is not affected in uteri of women with adenomyosis. *J Mol Neurosci.* 2012;47(3):495-504.

63. ML BdA, Arnold J, Sacher F, et al. Eutopic endometrium from women with endometriosis does not exhibit neurotrophic properties. *J Neuroimmunol.* 2012;249(1-2):49-55.
64. Borghese B, Vaiman D, Mondon F, et al. [Neurotrophins and pain in endometriosis]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2010;38(7-8):442-6.
65. Cowen T, Gavazzi I, Weingartner J, et al. Levels of NGF protein do not correlate with changes in innervation of the rat iris in old age. *Neuroreport.* 1996;7(13):2216-20.
66. Chavez-Genaro R, Crutcher K, Viettro L, et al. Differential effects of oestrogen on developing and mature uterine sympathetic nerves. *Cell Tissue Res.* 2002;308(1):61-73.
67. Bjorling DE, Beckman M, Clayton MK, et al. Modulation of nerve growth factor in peripheral organs by estrogen and progesterone. *Neuroscience.* 2002;110(1):155-67.
68. Kohn J, Aloyz RS, Toma JG, et al. Functionally antagonistic interactions between the TrkA and p75 neurotrophin receptors regulate sympathetic neuron growth and target innervation. *J Neurosci.* 1999;19(13):5393-408.
69. Barcena de Arellano ML, Arnold J, Vercellino GF, et al. Influence of nerve growth factor in endometriosis-associated symptoms. *Reprod Sci.* 2011;18(12):1202-10.
70. M.L. Barcena de Arellano, J. Arnold, C. Rüster, et al. Neurotrophine are overexpressed in the peritoneal fluid from women with pelvic endometriosis but not with intrauterine endometriosis. 2012.

7 Anhang

7.1 Eidesstaatliche Erklärung

„Ich, Franziska Wagner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse von Nervenfasern und Nervenwachstumsfaktoren in der Adenomyose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Berlin, den 05. Juni 2013

Franziska Wagner

7.2 Lebenslauf

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

7.3 Publikationsliste

“Neurotrophin expression is not affected in uteri of women with adenomyosis.”

M. L. Barcena de Arellano; Wagner, M. F.; Oldeweme, J.; Arnold, J.; Ebert, A.; Schneider, A.; Mechsner, S.

Journal of Molecular Neuroscience 47(3): 495-504; 2012/03/29

„Nachweis von Nervenfasern und Nervenwachstumsfaktoren in Adenomyosis uteri.“

F. Wagner; Barcena de Arellano, M.L.; Reichelt, U.; Ebert, A.D.; Mechsner, S.

Posterpräsentation auf dem 9. Endometriosekongress deutschsprachiger Länder 2011, Emmendingen.

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich PD Dr. Sylvia Mechsner für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit der Umsetzung dieser Arbeit im Endometrioselabor der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin. Insbesondere danke ich ihr für die vielen Anregungen, Impulse und Diskussionen mit denen sie diese Arbeit begleitet und vorangetrieben hat.

Mein ganz besonderer Dank geht an die umfangreiche Betreuung dieser Arbeit durch Frau Dr. Maria-Luisa Barcena de Arellano - ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke ihr sehr für die gute Einarbeitung, ihr unermüdliches Gehör für die vielen kleinen Probleme in der Umsetzung der Theorie in die Praxis, für die Zeit und Mühe immer neue Lösungsansätze zu diskutieren und nicht zuletzt für die kritischen Korrekturen dieser Arbeit.

Dem Team des Endometrioselabors danke ich für die herzliche Aufnahme. Vor allem gilt mein Dank Julia Arnold, die mich in die experimentellen Methoden eingeführt und bei der Versuchsdurchführung unterstützt hat.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Jeanette Oldeweme für ihre Unterstützung, Kritik und Ideen, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen.

Nicht zuletzt aber möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und Benjamin Noichl für ihren Rückhalt, die Unterstützung in jeglicher Form und den Ansporn danken. Durch zahlreiche Nachfragen und aufmunternde Worte hatte ich immer wieder neue Motivation, die es ermöglichte diese Arbeit fertigzustellen. Ich danke auch meinen Freunden sehr für ihr fortbestehendes Interesse und ihre Freude über die kleinen und großen Erfolge mit mir.