

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

DISSERTATION

Untersuchungen zum östrogenabhängigen Remodelling
sympathischer Nervenfasern bei Adenomyosis uteri

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jeannette Oldeweme

aus *Neuss*

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungsverzeichnis	6
Abstrakt.....	8
Abstract.....	10
1 Einleitung	12
1.1 Definition und Epidemiologie der Adenomyosis uteri.....	12
1.2 Symptomatik.....	14
1.3 Diagnostik.....	16
1.4 Therapie	17
1.5 Ätiologie und Pathogenese der Adenomyosis uteri	17
1.6 Uterine Innervation	20
1.6.1 Modulation der uterinen Innervation bei benignen gynäkologischen Erkrankungen	21
1.7 Neuroimmunmodulation	22
1.8 Östrogenrezeptoren.....	24
1.9 Ziel dieser Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialübersicht	27
2.2 Charakterisierung des Patientinnenkollektivs	32
2.2.1 Patientinnen für die immunhistochemische Analyse	32
2.2.2 Patientinnen für das neuronale Wachstumsassay	34

2.3	Materialgewinnung und Probenentnahme	35
2.3.1	Gewebeschnitte von Adenomyoseläsionen	35
2.3.2	Peritonealflüssigkeit	35
2.4	Immunhistochemische Färbung gegen die neuronalen Marker S 100, PGP 9.5, Tyrosinhydroxylase und Substanz P	35
2.5	Immunhistochemische Doppelfärbung gegen Tyrosinhydroxylase und Östrogenrezeptor α bzw. β	37
2.6	Auswertung der Nervenfaserdichte	39
2.6.1	Immunhistochemische Färbung gegen S 100, PGP 9.5, Tyrosinhydroxylase und Substanz P	39
2.6.2	Auswertung der Doppelfärbung gegen TH und Östrogenrezeptor α und β	40
2.7	Neuronales in-Vitro-Wachstumsassay.....	40
2.7.1	Lagerung und Bebrütung der Eier.....	40
2.7.2	Präparation der sympathischen paravertebralen Ganglien	40
2.7.3	Versuchsaufbau	41
2.7.4	Immunfluoreszenzanfärbung der paravertebralen Ganglien	42
2.8	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse.....	44
3.1	Charakterisierung von myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen Nervenfasern in den unterschiedlichen anatomischen uterinen Schichten von Frauen mit und ohne AM.....	44
3.1.1	Vergleich der Nervenfaserdichte in den unterschiedlichen anatomischen Schichten des uterinen Gewebes.....	46
3.1.1.1	Nervenfaserdichte im Myometrium	47

3.1.1.2	Nervenfaserdichte in der Junktionalzone und im Endometrium.....	48
3.1.2	Nervenfaserdichte innerhalb der AM-Läsion.....	50
3.1.3	Nervenfaserdichte in Bezug auf die Zyklusphasen im Myometrium von Patientinnen mit und ohne AM.....	52
3.1.4	Nervenfaserdichte und Korrelation zum Hormonstatus im Myometrium von Patientinnen mit und ohne AM.....	54
3.1.5	Nervenfaserdichte in Abhängigkeit von der Schmerzsymptomatik im Myometrium von Frauen mit und ohne AM.....	55
3.1.6	Gravidität.....	56
3.1.7	Parität	58
3.1.8	Koinzidenz von Endometriose.....	59
3.2	Immunhistochemische Doppelfärbung gegen Tyrosinhydroxylase und Östrogenrezeptor α und β	60
3.3	Neurotrophe Eigenschaften der AM	62
3.3.1	GAP 43- und TH-Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paravertebralen Ganglien	63
4	Diskussion	64
4.1	Innervation des Myometriums	64
4.2	Der Einfluss von Östrogen- und Adrenorezeptoren.....	69
4.3	Innervation des Endometriums und der endometrialen-myometrialen Junktionalzone.....	72
4.4	Innervation der Läsionen	75
4.5	Untersuchung der neuromodulierenden Eigenschaften der PF.....	75

5	Zusammenfassung	77
6	Anhang	78
6.1	Literaturverzeichnis	78
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	89
6.3	Tabellenverzeichnis.....	91
	Publikationsliste	92
	Lebenslauf	94
	eidesstattliche Versicherung	96
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	97
	Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

AM	Adenomyosis uteri
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX 2	Cyclooxygenase 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EM	Endometriose
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAP 43	<i>growth-associated protein 43</i>
HE	Hämatoxylin Eosin
IHC	Immunhistochemie
KG	Kontrollgruppe
l	Liter
IL	Interleukin
IVF	<i>In-Vitro-Fertilisation</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nn	nervi
μ l	Mikroliter

µm	Mikrometer
NA	Noradrenalin
NF	Nervenfaser
NGF	Nervenwachstumsfaktor (<i>nerve growth factor</i>)
NT-3	Neurotrophin 3
°C	Grad Celsius
P450 Arom	Aromatase P 450
Pat.	Patient (-in)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PF	Peritonealflüssigkeit
PGE 2	Prostaglandin 2
PGP 9.5	Protein Gen Produkt 9.5
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
Sema3F	Semaphorin 3F
STAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
Std	Stunde
Str.	Stratum
Sub P	Substanz P
TIAR	<i>tissue injury and repair</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
ÜN	über Nacht

Abstrakt

Untersuchungen zum östrogenabhängigen Remodelling sympathischer Nervenfasern bei Adenomyosis uteri

Einleitung

Aktuelle Publikationen beschreiben ein vermindertes Vorkommen von Nervenfasern (NF) im Myometrium sowie in der endometrialen-myometrialen Junctionalzone bei Patientinnen mit Adenomyose (AM). Interessanterweise ist die uterine Innervation einem östrogenabhängigen Remodelling ausgesetzt; eine Hochregulierung von Östrogen bewirkt eine Reduktion sympathischer NF, während diese bei niedrigen Östrogen-Konzentrationen wieder regenerieren. Möglicherweise ist diese hormonabhängige Regulierung uteriner NF bei Frauen mit AM gestört. Um das östrogenabhängige Remodelling der uterinen Innervation bei AM zu untersuchen, wurden NF immunhistochemisch in Gewebeschnitten von Frauen mit und ohne AM charakterisiert. Des Weiteren wurde die Bedeutung der Östrogenrezeptoren (ER) α und β in sympathischen NF und der Einfluss von AM auf die Peritonealflüssigkeit (PF) untersucht.

Methodik

Uterine Gewebeschnitte von Frauen mit AM (n=42) sowie gesundes uterines Gewebe von Patientinnen ohne AM und Endometriose (n=19) wurden immunhistochemisch analysiert, um PGP 9.5-, S100-, Substanz P (SP)- und Tyrosinhydroxylase (TH)-positive NF zu charakterisieren, um somit die Dichte intakter, myelinisierter, sensibler und sympathischer NF zu eruieren. Des Weiteren wurden uterine sympathische NF bezüglich der Expression von ER α und β untersucht. Außerdem wurde PF von AM sowie gesunden Patientinnen für ein neuronales *In-Vitro*-Wachstumsassay genutzt.

Ergebnisse

AM-Läsionen sowie Endometrium von Frauen mit und ohne AM sind nicht innerviert. Die Dichte sympathischer NF im Myometrium von Frauen mit AM ist signifikant

reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe (KG). Der Rückgang sympathischer NF ist bei Frauen mit AM unabhängig von Zyklus, Hormonmedikation, Gravidität und Parität. Das Verhältnis von ER α zu ER β in myometrialen TH-positiven NF ist bei Frauen mit AM im Vergleich zur KG tendenziell zu ER α verschoben. PF von Patientinnen mit und ohne AM zeigt keine Unterschiede in der neuronalen Aussprossung.

Schlussfolgerung

Die gestörte Modulierung uteriner sympathischer NF scheint ein wesentlicher Aspekt in der Pathogenese von AM zu sein. Interessanterweise spielen vor allem Östrogen und seine Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Regulierung myometrialer sympathischer NF.

Abstract

Investigations of the estrogen-dependent remodelling of sympathetic nerve fibers in adenomyosis

Introduction

Current publications suggest a decrease of nerve fibers (NF) in the myometrium and in the endometrial-myometrial interface of adenomyosis (AM) specimens. Interestingly, uterine innervation undergoes an estrogen-dependent remodelling; an estrogen upregulation depletes sympathetic NF, while nerves recover with low estrogen concentrations. This may imply a dysfunctional regulation of hormone-dependent physiological changes in uterine innervation in AM. In order to investigate the estrogen-dependent remodelling of uterine innervation in AM, we characterized NF in AM specimens and in a control group, using immunohistochemistry. Furthermore, we analyzed the interaction of estrogen receptor (ER) α and β and sympathetic NF as well as the impact of AM on peritoneal fluid (PF).

Methods

Serial uterine sections of AM specimens (n=42) as well as healthy uterine tissue from patients without AM and endometriosis (n=19) were immunohistochemically analyzed to identify PGP 9.5-, S100-, substance P (SP)- and tyrosine hydroxylase (TH)-positive NF to evaluate the density of all intact, myelinated, sensory and sympathetic NF, respectively. Furthermore, the expression of estrogen receptor (ER) α and ER β in uterine sympathetic NF was analyzed. In addition, PF from patients with AM and healthy patients was used for an *in vitro* neuronal growth assay.

Results

AM lesions and endometrium of women with and without AM are not innervated. The density of sympathetic NF in the myometrium of women with AM is significantly reduced when compared to the control group. The depletion of sympathetic NF in AM is independent from the menstrual cycle, hormonal therapy, gravidity and parity. The ER α and β ratio tended to be shifted to the ER α side in the myometrial TH-positive

NF in AM patients compared to the controls. PF from patients with and without AM showed no differences in neuronal outgrowth.

Conclusion

The disruption of the modulation of the uterine sympathetic NF seems to be an important aspect in the pathogenesis of AM. Interestingly, estrogen and its receptors seem to play a crucial role in the depletion of the myometrial sympathetic NF.

1 Einleitung

Unter Adenomyosis uteri (AM) versteht man eine gutartige gynäkologische Erkrankung von Frauen im reproduktionsfähigen Alter mit unklarer Ätiologie. Sie wird per definitionem als *Endometriosis genitalis interna* dem Krankheitsbild der Endometriose (EM) zugeordnet (Ebert 2003; Tariverdian et al. 2007). Obwohl schon im Europa des 17. und 18. Jahrhunderts Beschreibungen dieses Krankheitsbildes aufkamen, war es 1860 der deutsche Pathologe Carl von Rokitansky, der erstmals endometriale Drüsen im Myometrium nachweisen konnte und diese Entdeckung als „*cystosarcoma adenoides uterinum*“ beschrieb. Die erste systematische Erforschung und Beschreibung des Einwachsens uteriner Mukosa in das Myometrium geht Anfang des 20. Jahrhunderts auf Thomas Stephen Cullen zurück. Im Jahre 1925 hat schließlich Frankl dem Krankheitsbild den Namen „Adenomyosis uteri“ gegeben, der bis heute allgemein verwendet wird und nach der im Jahre 1972 aufgestellten Definition von Bird das im Folgenden beschriebene Krankheitsbild beschreibt (Benagiano and Brosens 2006).

1.1 Definition und Epidemiologie der Adenomyosis uteri

Histopathologisch spricht man von AM, wenn endometriale Drüsen und Stromazellen mindestens 2,5 mm von der endometrialen-myometrialen Junctionalzone entfernt lokalisiert sind und von hypertrophem und hyperplastischem Myometrium umgeben werden (Keckstein 2000; Bergeron et al. 2006; Levgur 2007; Wang et al. 2009). Man spricht im Allgemeinen von AM-Läsionen oder -Herden, die des Weiteren in fokale und diffuse Formen unterteilt werden können. Bei der fokalen Form von AM handelt es sich um gut abgrenzbare Herde, sogenannte knötchenartige Läsionen. Auch jene Läsionen, die nur eine uterine Wand betreffen, werden als fokal bezeichnet. Alle anders ausgeprägten Formen werden dementsprechend als diffus beschrieben und in superfizielle und tiefer gelegene Herde eingeteilt (Kepkep et al. 2007; Wang et al. 2009); siehe Abbildung 1). Im Allgemeinen wird beobachtet, dass bei einem Vorliegen von AM die hintere Uteruswand häufiger betroffen ist als die anderen Uteruswände (Devlieger et al. 2003; Levgur 2007).

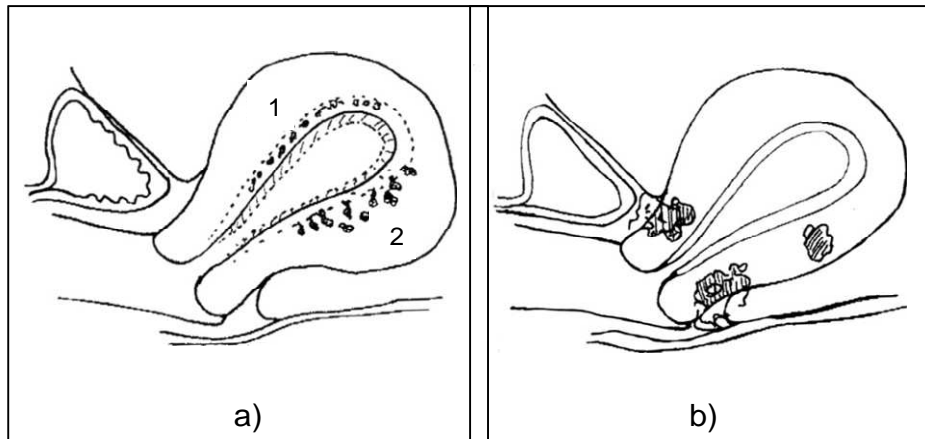


Abbildung 1: unterschiedliche Formen von AM

a) Dargestellt ist die diffuse Form der AM (1: superfiziale AM in der vorderen Uteruswand; 2: tiefe AM in der hinteren Uteruswand). b) Hier ist die fokale Form der AM im Bereich des Zervix dargestellt (aus Keckstein 2000).

Obwohl es sich bei AM und EM um zwei unterschiedliche Manifestationen von disloziertem basalem Endometrium handelt, wird das gleichzeitige Vorhandensein beider Formen sehr häufig beobachtet. Demnach liegt die Prävalenz einer AM bei EM-Patientinnen bei bis zu 90% (Kunz et al. 2005).

Bei beiden Krankheitsformen spielt der Östrogenhaushalt eine entscheidende Rolle. Sowohl EM als auch AM sind demnach östrogenabhängige Krankheiten, die folglich nur Frauen im reproduktionsfähigen Alter betreffen und entsprechende Symptome hervorrufen können (Kitawaki 2006). Mit dem Einsetzen der Menopause sinkt typischerweise die Östrogenkonzentration und mit ihr setzt ein Rückgang der Beschwerdesymptomatik ein (Kitawaki 2006). In Abbildung 2 ist das laparoskopische und hysteroskopische Erscheinungsbild der AM dargestellt.

In der Gynäkologie ist AM ein relativ häufiges Krankheitsbild. Generell lässt sich jedoch keine verlässliche Aussage zur Prävalenz machen. Die Angaben in der Literatur variieren mit 1-70% sehr stark (Bird et al. 1972; Vavilis et al. 1997; Bergholt et al. 2001; Devlieger et al. 2003; Ebert 2003; Kepkep et al. 2007). Diese sehr unterschiedlichen Prävalenzangaben erklären sich zum einen durch die schwierige Diagnosestellung, die belegbar erst nach einer Hysterektomie möglich ist, für die sich jedoch nicht alle Patientinnen entscheiden. Zum anderen sind die Beschwerden oft sehr unterschiedlich ausgeprägt und dadurch ist die Diagnosestellung im Allgemeinen schwierig. Dies führt dazu, dass die Erkrankung in den meisten Fällen erst viele Jahre nach dem ersten Auftreten von Symptomen diagnostiziert wird.

Erst in den letzten Jahren werden zunehmend auch der Ultraschall und das MRT für die Diagnostik hinzugezogen (Kunz et al. 2005). Dennoch sind diese Verfahren nicht beweisend, so dass in den meisten Fällen die endgültige Diagnose erst in der vierten bis fünften Lebensdekade nach abgeschlossener Familienplanung im Rahmen einer Hysterektomie gestellt wird (Bird et al. 1972; Ferenczy 1998; Devlieger et al. 2003; Quinn 2007; Li et al. 2011). Auch wenn AM meistens bei Frauen zwischen 40 und 50 Jahren entdeckt wird, gibt es viele Fälle, in denen bereits Jugendliche und junge Frauen schon ausgeprägte Erkrankungsformen haben (mündliche Mitteilung; S. Mechsner).

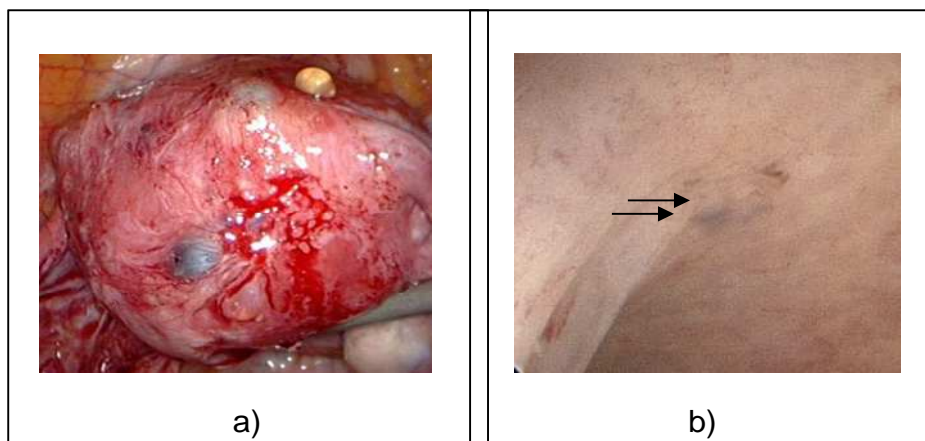


Abbildung 2: Adenomyosis uteri

a) klinisches Erscheinungsbild einer intraoperativ gesicherten AM bei einer 30-jährigen Patientin mit Kinderwunsch; b) hysteroskopisches Erscheinungsbild einer AM (siehe schwarze Pfeile)

1.2 Symptomatik

Die Symptome und Beschwerden sind nicht bei allen Patientinnen in gleicher Art und Weise ausgeprägt. Der Schweregrad der Symptome korreliert meistens mit Größe, Anzahl und Eindringtiefe der Läsionen in das Myometrium (Azziz 1989). In den meisten Fällen klagen Frauen mit AM über Hypermenorrhoe (40-50%), Dysmenorrhoe (15-30%) oder Metrorrhagie (10-20%), eher selten werden Symptome wie Dysurie und Dyschezie beobachtet. Die genannten Symptome sind jedoch sehr unspezifisch und können auch beim Vorliegen anderer gynäkologischer Erkrankungen, wie zum Beispiel der dysfunktionalen Uterusblutung, Myomen oder EM, auftreten (Devlieger et al. 2003). Neben den typischen Symptomen gibt es jedoch auch viele Patientinnen mit asymptomatischen Krankheitsverläufen, die mit

ca. 24-35% relativ häufig beobachtet werden können (Bird et al. 1972; Matalliotakis et al. 2005). Durch die die Läsion umgebende hyperplastische glatte Muskulatur stellt sich der Uterus klinisch meist typisch vergrößert dar und bietet dem untersuchenden Arzt Anhalt für weiterführende Untersuchungen (Devlieger et al. 2003). Mit dem Vorliegen von AM können in den meisten Fällen auch andere Formen von EM (Kunz et al. 2005; Leyendecker and Kunz 2005; Leyendecker et al. 2006) sowie uterine Myome beobachtet werden (Mathur et al. 1962; Quinn and Kirk 2002). Außerdem liegt bei einigen Patientinnen eine Koinzidenz von Adenokarzinomen vor (Ferency 1998; Mechsner et al. 2002). Des Weiteren können bei einem Vorliegen von AM auch Fertilitätsbeeinträchtigungen auftreten (Bird et al. 1972; Matalliotakis et al. 2005; Kitawaki 2006; Ballester et al. 2012). Beispielsweise beschreibt Kunz einen signifikanten Zusammenhang von infertilen Patientinnen mit AM und peritonealer EM (Kunz et al. 2000). Auch in tierexperimentellen Versuchen an Pavianen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von AM und lebenslanger Infertilität beobachtet werden (Barrier et al. 2004). Die Infertilität bei Patientinnen mit AM resultiert hierbei möglicherweise daraus, dass ein intakter gerichteter Spermientransport durch die im Myometrium lokalisierten AM-Herde und die sich dadurch ergebene irreguläre Anordnung der Muskelfasern nicht mehr gewährleistet ist (Leyendecker and Kunz 2005). Bei einer Prävalenz von AM bei vorliegender EM bei bis zu 90% postuliert Leyendecker, dass die Infertilität auf die gleichzeitig bestehende AM zurückzuführen ist. Aktuelle klinische Untersuchungen bestätigen, dass ein Vorliegen von AM den Erfolg einer *In-Vitro-Fertilisation* (IVF) negativ beeinflusst (Ballester et al. 2012). Allerdings gibt es auch andere Publikationen, in denen beschrieben wird, dass Frauen mit AM nicht infertil sind, sondern dass im Gegenteil sogar häufiger mehrgebärende Frauen betroffen sind, als Frauen, die keine Kinder geboren haben (Mathur et al. 1962; Azziz 1989; Ferency 1998; Devlieger et al. 2003; Bergeron et al. 2006; Kitawaki 2006). Da die endgültige Diagnose einer AM jedoch nur an einem Hysterektomiepräparat gestellt werden kann, sollte berücksichtigt werden, dass Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch diesen endgültigen Schritt vermeiden wollen und eine Hysterektomie lediglich als Ultima Ratio in Betracht ziehen. Somit gibt es vermutlich mehr infertile Frauen mit AM als in der Literatur bekannt ist.

1.3 Diagnostik

Mit dem Vorliegen der entsprechenden klinischen Symptome kann eine erste Verdachtsdiagnose gestellt werden. Diese wird dann im weiteren Verlauf der Diagnosestellung durch nicht invasive bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel die transvaginale Sonografie und/oder MRT-Untersuchungen, ergänzt (Reinhold et al. 1998; Leyendecker and Kunz 2005; Kepkep et al. 2007; Valentini et al. 2011), siehe Abbildung 3). Es ist auch bekannt, dass laparoskopisch gewonnene uterine Biopsien zur Diagnosestellung herangezogen werden können. Diese erzielten bisher jedoch noch nicht ausreichend zuverlässige Ergebnisse (Vercellini et al. 1998). Auch wenn die präoperativen Untersuchungen zur Diagnostik mit der Zeit immer genauer werden, kann eine definitive Diagnose erst am Hysterektomiepräparat mit anschließender histopathologischer Untersuchung gestellt werden (Ferenczy 1998).

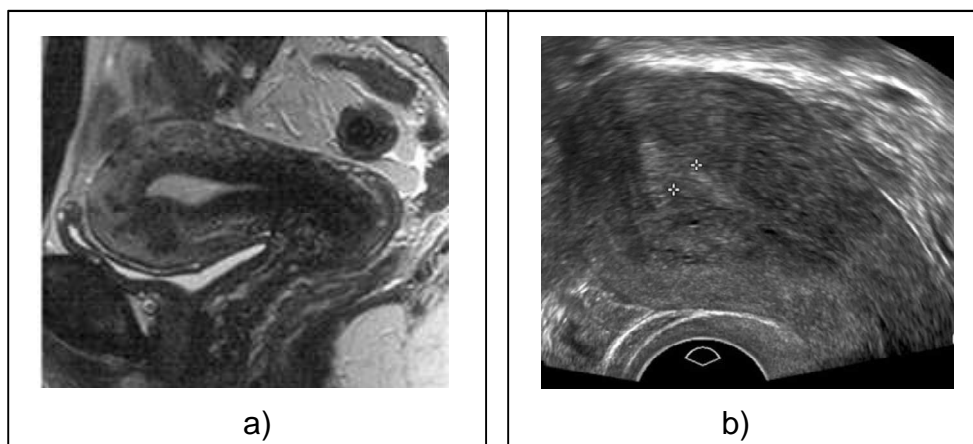


Abbildung 3: Bildgebende Verfahren zur Diagnostik der AM

a) Darstellung der AM im MRT (aus Leyendecker et al. 2009); b) Darstellung der AM im Ultraschall (aus Levy et al. 2012)

1.4 Therapie

Im Rahmen der Therapiemöglichkeiten gibt es unterschiedliche Ansätze, wobei zwischen chirurgischen und medikamentösen Therapieoptionen sowie komplementären Behandlungsmaßnahmen unterschieden werden muss (Ebert 2003). Für welche Art der Therapie sich der behandelnde Arzt und die betroffene Patientin entscheidet, hängt von verschiedenen Parametern ab. Das Patientenalter, die Beschwerdesymptomatik, die Familienplanung sowie Lokalisation und Ausmaß der Läsion sollten bei der Therapieplanung berücksichtigt werden. Die chirurgische Therapie der Wahl stellt die Hysterektomie dar. In Einzelfällen, beispielsweise bei Patientinnen mit vorhandenem Kinderwunsch, kann auch bei fokaler AM die Exzision des betroffenen Gewebes in Erwägung gezogen werden. Aktuell gibt es bei einem Vorliegen von diffuser AM Ansätze für eine Uterus-erhaltende operative Therapie, bei der eine radikale Exzision der AM im Sinne eines Aushöhlen des Uterus vorgenommen und dieser anschließend wieder rekonstruiert wird (Osada et al. 2010).

Für die medikamentöse Therapie werden in der Praxis verschiedene Substanzgruppen in Betracht gezogen. Hier werden gezielt die Dysmenorrhoe und die Hypermenorrhoe behandelt. Dabei werden hauptsächlich Gestagene, orale Kontrazeptiva, und GnRH-Agonisten eingesetzt (Devlieger et al. 2003). Am häufigsten werden hierbei die oralen Kontrazeptiva zyklisch oder im non-stop-Einnahmemodus (Dmitrovic et al. 2012) oder die Hormonspirale eingesetzt. Einen kausalen Therapieansatz gibt es aufgrund der noch unzureichend geklärten Pathogenese noch nicht, daher sind die unterschiedlichen Therapieansätze ausschließlich symptombezogen.

1.5 Ätiologie und Pathogenese der Adenomyosis uteri

Bisher ist die genaue Ätiologie und Pathogenese unzureichend geklärt, und obwohl es mögliche Theorien zur Pathogenese der AM gibt, konnte bisher keine ausreichende Evidenz für einen Konsens gefunden werden. In der Literatur gibt es Beschreibungen, die postulieren, dass das Einwandern von basalem Endometrium entlang intramyometrialer lymphatischer Bahnen verlaufen könnte (Sahin et al.

1989). Eine andere Theorie besagt, dass die Läsionen im Sinne einer Metaplasie aus ortsständigen Zellen entstehen könnten, die sich unter dem Einfluss verschiedener Stimuli, wie zum Beispiel Inflamationsreize, Hormonschwankungen, Wachstumsfaktoren oder mechanische Alterationen, zu Endometrium-ähnlichen Zellen differenzieren (Ebert 2003; Bergeron et al. 2006).

Die meist angenommene und verbreitete Hypothese besagt, dass das basale Endometrium in das basal gelegene Myometrium einwandert. In Schnittpräparaten ist häufig eine Kontinuität zwischen Läsion und Endometrium zu beobachten, welches die Theorie unterstützt, dass das basal gelegene Endometrium im Sinne einer Invagination in das darunter liegende Myometrium wandert (Parrott et al. 2001). Dadurch stellt sich der Übergang der Basalis in das Myometrium unregelmäßig dar (Mechsner et al. 2010); siehe Abbildung 4). Dies könnte möglicherweise auf eine Schwäche der uterinen glatten Muskulatur oder ein Trauma (z.B. durch Kürettage) zurückzuführen sein (Parrott et al. 2001).

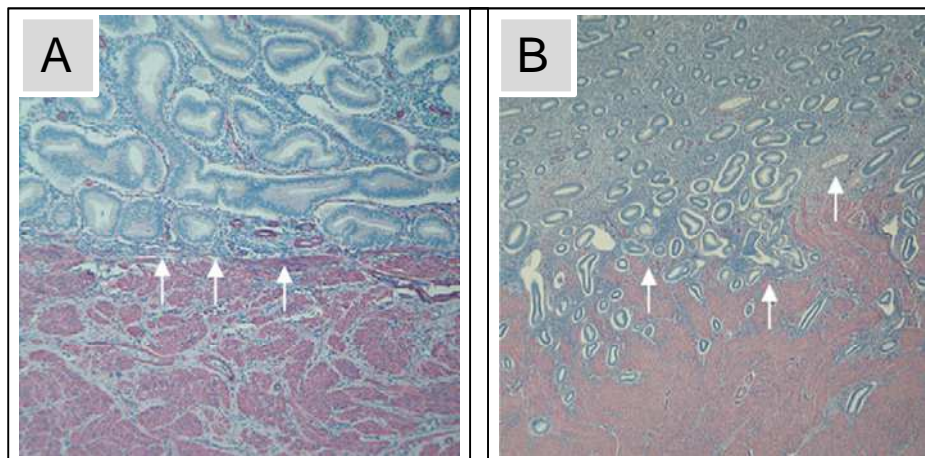


Abbildung 4: immunhistochemische Darstellung der endometrialen-myometrialen Junctionalzone

A) klare Abgrenzung zwischen Endometrium und Myometrium bei Patienten ohne AM; B) unregelmäßiger Übergang zwischen Endometrium und Myometrium bei Patienten mit AM (aus Mechsner et al. 2010)

Diese sogenannten myometrialen Dehiszenzen könnten auch durch eine lokale Aromataseüberexpression und einer demzufolge erhöhten lokalen Östrogenbiosynthese hervorgerufen werden (Yamamoto et al. 1993; Yamamoto et al. 1993a; Noble et al. 1996; Kitawaki et al. 1997). Die dadurch resultierende erhöhte lokale Östrogenkonzentration induziert möglicherweise eine uterine Hyperperistaltik, weshalb es aufgrund der unphysiologisch starken Kontraktionen zur Mikrotraumatisierung innerhalb des basalen Endometriums und zur Bildung von

myometrialen Dehiszenzen kommt, in die schlussendlich das basale Endometrium infiltrieren und AM-Läsionen bilden kann (Leyendecker and Kunz 2005). In der Literatur wird das Krankheitsbild daher auch als „Syndrom des dislozierten basalen Endometriums“ (SDBE) beschrieben (Leyendecker and Kunz 2005). Möglicherweise wird durch eine Mikrotraumatisierung parallel das sogenannte TIAR- (*tissue injury and repair*) System aktiviert (Leyendecker et al. 2009). Dies bedeutet, dass bedingt durch eine Gewebeschädigung die Bildung des Botenstoffes Interleukin 1 β induziert wird. Infolgedessen kommt es zu einer Hochregulation der Cyclooxygenase (COX) 2 und anschließender Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Synthese. PGE₂ aktiviert sowohl steroidogenic acute regulatory protein (StAR) als auch die P450 Aromatase (Leyendecker et al. 2009; siehe Abbildung 5). StAR ist ein Protein, das für den Transport von Cholesterol, einer Vorstufe von Testosteron, verantwortlich ist (Rone et al. 2009). Die P450 Aromatase aromatisiert Testosteron zu Östradiol und setzt mit der lokalen Östrogenproduktion und der daraus erneut resultierenden Hyperperistaltik einen *circulus vitiosus* in Gang (Leyendecker et al. 2009).

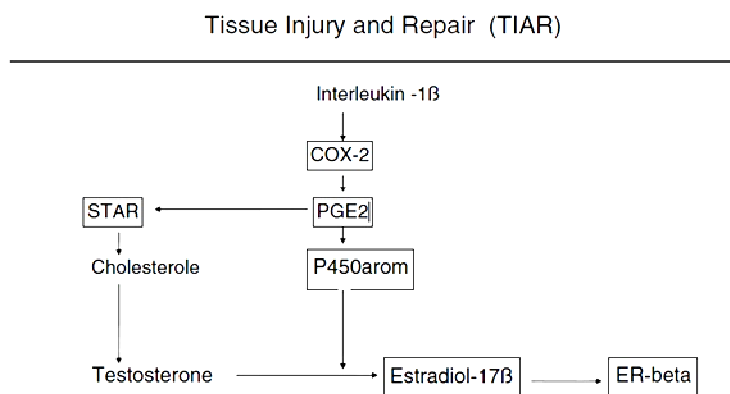


Abbildung 5: Schematische Darstellung des TIAR-Pathomechanismus (Leyendecker et al. 2009)

COX-2 = Cyclooxygenase 2; PGE2 = Prostaglandin 2; STAR = *steroidogenic acute regulatory protein*; P450arom = Aromatase P450; ER-beta = Östrogenrezeptor β

Die derzeit veröffentlichten Daten reichen bislang nicht aus, um die Pathogenese von EM und AM vollständig zu klären.

Ein weiterer möglicher entscheidender Faktor in der Entstehung der AM und der Entwicklung von Symptomen stellen Veränderungen in der uterinen Innervation dar. In den letzten Jahren konnten viele Publikationen zeigen, dass es bei Patientinnen

mit peritonealen Endometrioseläsionen zu weitreichenden Veränderungen in der peritonealen Innervation und auch in den endometrialen Schichten kommt (Tokushige et al. 2006; Tokushige et al. 2006a; Mechsner et al. 2007; Mechsner et al. 2009; Barcena de Arellano et al. 2010; Arnold et al. 2011). Daten hinsichtlich der Innervation in AM-Läsionen finden sich hingegen nur spärlich und demzufolge ist hier die Datenlage sehr unzureichend.

1.6 Uterine Innervation

Es ist allgemein bekannt, dass NF ubiquitär vorhanden sind und somit auch im Uterus nachgewiesen werden können (Krantz 1959).

Die sympathischen NF entspringen im Seitenhorn des Rückenmarks auf Höhe von Th10-L1 und gelangen über *Nn. splanchnici lumbales* zum *Plexus hypogastricus superior et inferior* und von diesem zum *Plexus pelvicus*, um von dort in den Uterus zu inserieren und die glatte Muskulatur sowie die Gefäße zu innervieren. Die sensiblen NF lagern sich den vegetativen Fasern an und gelangen vom Uterus zu den Segmenten Th10-L1, um als afferente Bahnen zum Gehirn zu verlaufen (Fanghänel et al. 2003).

Die anatomischen Schichten des gesunden Uterus - Myometrium und Endometrium mit Stratum basale und functionale - werden dabei unterschiedlich innerviert (Quinn and Kirk 2002). Intakte NF sind sowohl im Myometrium als auch im basalen Drittel des Endometriums nachweisbar, während in der zum Cavum gerichteten Schicht, dem Stratum functionale, keine NF nachweisbar sind (Quinn and Kirk 2002; Barcena de Arellano et al. 2012).

Des Weiteren ist bekannt, dass die uterine Innervation durch natürliche hormonelle Schwankungen während des Zyklus und während der Schwangerschaft moduliert wird (Haase et al. 1997; Latini et al. 2008). In Tierversuchen konnte eine derartige Modulierung vor allem seitens der sympathischen NF beobachtet werden (Zoubina et al. 1998; Zoubina et al. 2001; Zoubina and Smith 2001). In weiterführenden Untersuchungen an Ratten konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl uteriner sympathischer NF durch die Gabe von Östrogenen sinkt (Brauer et al. 1995; Krizsan-

Agbas and Smith 2002). Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass Östrogen die uterine Innervation seitens der sympathischen NF moduliert.

1.6.1 Modulation der uterinen Innervation bei benignen gynäkologischen Erkrankungen

Aktuell wird postuliert, dass bei Patientinnen mit gynäkologischen Erkrankungen wie zum Beispiel EM, AM oder uterinen Myomen NF im Endometrium, speziell im Stratum functionale vorkommen können (Tokushige et al. 2006; Al-Jefout et al. 2009; Zhang et al. 2009; Zhang et al. 2009a). Hier ist die Datenlage derzeitig aber sehr kontrovers und wird kritisch diskutiert. Es gibt Autoren, die das Vorkommen von NF im Stratum functionale als EM-spezifisches Phänomen beschreiben (Tokushige et al. 2006; Al-Jefout et al. 2007; Al-Jefout et al. 2009), und andere, die es als schmerzabhängiges Phänomen (Zhang et al. 2009; Zhang et al. 2009) interpretieren.

In einer klinischen retrospektiven Studie konnte Zhang (Zhang et al. 2009) beispielsweise ein Vorhandensein von Protein Gen Produkt 9.5 (PGP 9.5)-positiven intakten NF im Stratum functionale des Endometriums bei Patientinnen mit AM alleine, EM alleine, AM und EM sowie Patientinnen mit uterinen Myomen zeigen. Die NF waren jedoch nur bei positiver Schmerzanamnese nachweisbar. Interessanterweise konnten bei Patientinnen ohne Schmerzsymptomatik keine NF nachgewiesen werden (Zhang et al. 2009). Demzufolge wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Vorhandensein von NF im Stratum functionale des Endometriums mit dem Vorhandensein von Schmerzen korrelieren könnte.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte im Stratum functionale von Patientinnen mit EM kleine unmyelinisierte NF nachweisen (Tokushige et al. 2006; Al-Jefout et al. 2007; Al-Jefout et al. 2009). Diese waren jedoch unabhängig von der Schmerzsymptomatik nachweisbar. Bei Patientinnen ohne EM konnten im Gegensatz dazu in der gleichen Schicht keine NF nachgewiesen werden (Tokushige et al. 2006; Al-Jefout et al. 2009). Dies führte zu der Annahme, dass NF schmerzunabhängig nur bei Frauen mit EM im Stratum functionale des Endometriums vorhanden sind und dass das Vorhandensein von NF im Endometrium möglicherweise einen Ansatz für einen semiinvasiven Test bieten könnte, um das Vorliegen einer EM zu diagnostizieren.

In Bezug auf AM haben Quinn und Kollegen erstmals Untersuchungen hinsichtlich der uterinen Innervation durchgeführt. Sie konnten nachweisen, dass die NF-Dichte bei Patientinnen mit AM im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe vermindert ist. Sowohl im Myometrium als auch in der endometrialen-myometrialen Junktionalzone waren bei AM-Patientinnen weniger NF vorhanden als in der Kontrollgruppe (Quinn and Kirk 2002; Quinn 2007). Innerhalb der AM-Läsionen konnten gar keine NF nachgewiesen werden (Quinn 2007).

Zurzeit bestehen bezüglich des Vorkommens von NF im Stratum functionale und deren Bedeutung noch massive Unklarheiten.

1.7 Neuroimmunmodulation

Veränderungen in der Innervation – die sogenannte neurogene Modulation - von entzündlich betroffenen Geweben sind nicht nur in EM und AM bekannt, sondern konnten auch in anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen untersucht werden. Es gibt viele Hinweise dafür, dass sowohl das Nervensystem mit seinen lokal sezernierten Neurotransmittern als auch lokale Östrogenkonzentrationen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Autoimmunerkrankungen spielen (Cutolo et al. 2006; Straub 2007). Beispielsweise konnte bei Patienten mit Morbus Crohn in allen Schichten des Kolons eine signifikante Reduktion der sympathischen TH-positiven NF im Gegensatz zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Straub et al. 2008). Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Miller et al. 2000), Darmendometriose (Ferrero et al. 2010), Pruritus (Haas et al. 2010), Typ1-Diabetes mellitus (Mei et al. 2002) oder peritonealen Endometrioseläsionen (Arnold et al. 2011) konnte ein Rückgang von sympathischen NF nachgewiesen werden. Der Verlust von sympathischen NF korreliert dabei mit dem Grad der Entzündung (Miller et al. 2000).

Sowohl das sympathische als auch das sensible Nervensystem beeinflussen das Immunsystem durch eine lokale Freisetzung von Neurotransmittern (Straub 2007). Die sympathischen NF führen über die Wirkung ihrer Neurotransmitter (vor allem Noradrenalin) zu antiinflammatorischen Effekten (Miller et al. 2000; Straub 2007). Ein Verlust der sympathischen NF führt demzufolge zu einer geringeren Konzentration dieser antiinflammatorischen Neurotransmitter im Gewebe. Dies ist ungünstig in der

chronischen Phase einer entzündlichen Erkrankung. Im Gegensatz dazu führt das in sensiblen NF exprimierte Neuropeptid Substanz P durch Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , Interleukin 6 und 8 (Lotz et al. 1988; Kavelaars et al. 1994) zu überwiegend entzündlichen Effekten (siehe Abbildung 6). Sympathische und sensible Neurotransmitter spielen demzufolge eine gegenregulatorische Rolle in der Entzündungsreaktion in chronisch entzündlichen Erkrankungen (Straub 2007).

Umfangreiche Daten zur gegenregulatorischen Rolle des sympathischen und sensiblen Nervensystems sind im Forschungsgebiet der rheumatoiden Arthritis erhoben worden. Hier konnte gezeigt werden, dass vor allem das sympathische Nervensystem eine sehr wichtige Rolle spielt, da es sowohl entzündungsfördernde als auch entzündungshemmende Eigenschaften besitzt (Harle et al. 2006). Dabei scheint das sympathische Nervensystem die Initialphase von chronisch inflammatorischen Erkrankungen zu begünstigen (Harle et al. 2006), während es die Entzündung in der späteren Phase der chronischen Inflammation inhibiert (Harle et al. 2006).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl sympathische als auch sensible Nervenfasern einer extremen Veränderung in entzündeten Regionen bei Autoimmunkrankheiten unterlegen sind. Diese Veränderung kommt allerdings nur im erkrankten Gewebe vor, während die nicht entzündeten Regionen nicht betroffen sind (Straub 2007; Straub 2007).

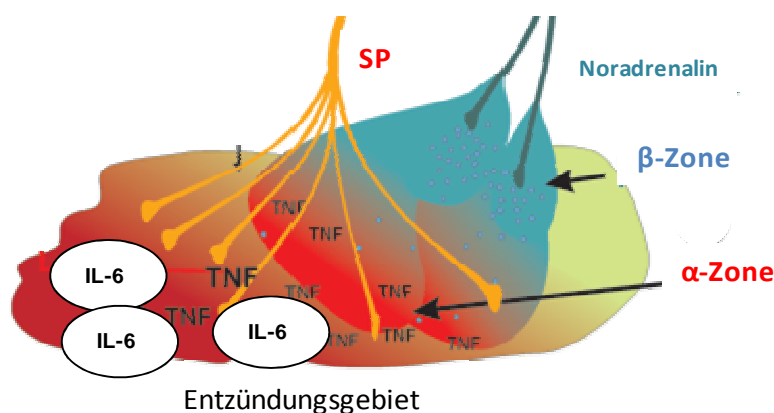


Abbildung 6: schematische Darstellung des Einflusses sympathischer und sensibler NF auf das Entzündungsgebiet
 Die roten Farben (α -Zone) zeigen die Entzündungsgebiete an, während die grünen und blauen Farben (β -Zone) die gesunden Gebiete bezeichnen. orange = sensible NF; blau = sympathische NF; TNF = Tumor Nekrose Faktor; IL-6 = Interleukin 6; SP = Substanz P (aus Straub and Harle 2005)

EM weist eine ganze Reihe von Parallelen zu chronisch entzündlichen Erkrankungen auf und kann ebenfalls zu diesem Formenkreis gezählt werden. Auch in peritonealen EM-Läsionen konnten ähnliche Ergebnisse im Sinne einer Dysbalance zwischen sympathischen und sensiblen NF nachgewiesen werden (Arnold et al. 2011). In *In-Vitro*-Versuchen induziert die Peritonealflüssigkeit (PF) von Patientinnen mit peritonealer EM ein Aussprossen von Neuriten aus sensiblen Ganglien, während sympathische Ganglien eher eine gehemmte Aussprossung aufweisen (Arnold et al. 2011).

Die Untersuchungen beziehen sich bislang nur auf das Krankheitsbild der peritonealen EM und sollen nun auf Patientinnen mit AM übertragen werden.

1.8 Östrogenrezeptoren

Da es sich bei AM um eine östrogenabhängige Erkrankung handelt, spielen sowohl Östrogene als auch Östrogenrezeptoren (ER) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese (Kitawaki 2006).

Östrogenrezeptoren sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die zu den Steroidhormonrezeptoren gehören (Dahlman-Wright et al. 2006). Die Wirkung von Östrogen wird durch die Bindung an die intrazellulären Östrogenrezeptoren induziert (Korach et al. 1996), von denen bislang drei Subtypen charakterisiert werden konnten. Der zuletzt entdeckte G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor GPR30 wird im kardiovaskulären System exprimiert (Meyer et al. 2011). Die Östrogenrezeptoren ER α und ER β sind mittlerweile schon vielfältig untersucht worden und stehen auch heute noch im Fokus der Forschung. Obwohl sie von verschiedenen Genen kodiert werden, weisen sie eine ähnliche Struktur auf (Enmark and Gustafsson 1999). Dabei ist ER α hauptsächlich im Uterus, im Hoden, im Brustdrüsengewebe, in der Leber, in den Nieren, im Herz und in der Hypophyse (Kuiper and Gustafsson 1997) exprimiert, während ER β vor allem im Ovar und in der Prostata vorkommt (Couse et al. 1997). Beide Östrogenrezeptoren können jedoch auch im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen werden (Sar and Parikh 1986; Shughrue et al. 1997; Simonian and Herbison 1997; Papka et al. 2001) und es wird postuliert, dass sowohl ER α als auch ER β die östrogenabhängige Modulation sympathischer NF induzieren (Zoubina and Smith 2002).

Die uterine Innervation wird durch hormonelle Schwankungen moduliert (Haase et al. 1997; Richeri et al. 2005; Latini et al. 2008). In Tierversuchen konnte eine zyklusabhängige Modulation vor allem seitens der sympathischen NF beobachtet werden (Zoubina et al. 1998; Zoubina et al. 2001). Diese Modulation scheint dabei in Abhängigkeit zur Östrogenkonzentration zu stehen (Krizsan-Agbas et al. 2003), da in östrogenreichen Phasen des weiblichen Zyklus ein Rückgang sympathischer NF nachgewiesen werden konnte, wohingegen in östrogenarmen Phasen des Zyklus ein Anstieg der Anzahl sympathischer NF beobachtet wurde (Latini et al. 2008; siehe Abbildung 7). Des Weiteren konnte in Tiermodellen an Ratten gezeigt werden, dass die Gabe von Östrogenen zu einer Reduktion noradrenalinhaltiger sympathischer NF im Myometrium führt (Brauer et al. 1995; Krizsan-Agbas and Smith 2002).

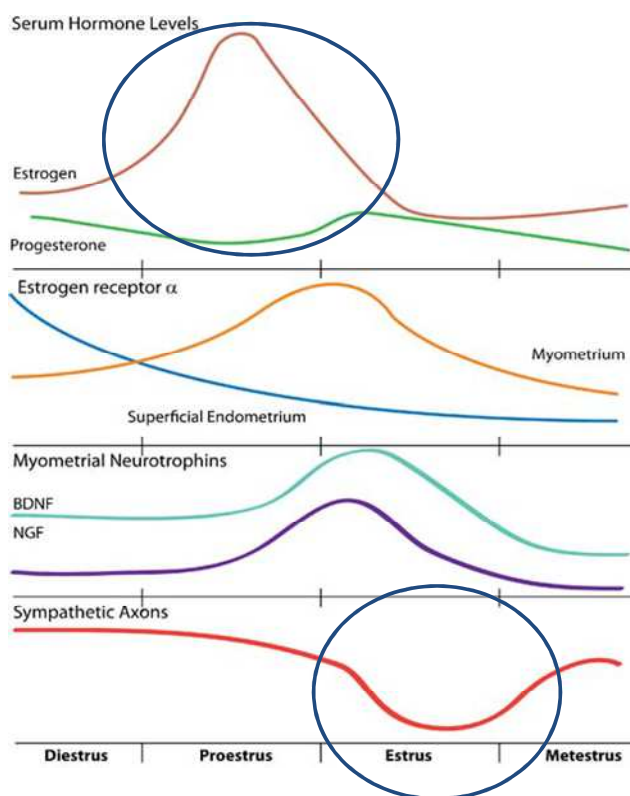


Abbildung 7: Darstellung der Zyklusabhängigkeit der sympathischen NF

Auf eine östrogenreiche Phase des Zyklus folgt ein Rückgang sympathischer NF (aus Latini 2008).

1.9 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, mittels immunhistochemischer Methoden die uterine Innervation bei Patientinnen mit histologisch gesicherter AM in den verschiedenen anatomischen Schichten des Uterus zu charakterisieren und diese mit Kontrollpatientinnen ohne AM und ohne EM zu vergleichen. Dabei sollte vor allem die Untersuchung der sympathischen NF und deren zyklusabhängige Modulation im Fokus der Untersuchungen stehen. Außerdem sollten die Regulationsmechanismen von ER α und β auf die sympathische Innervation anhand von immunhistochemischen Doppelfärbungen untersucht werden. Um die neurotrophen Eigenschaften der PF beim Vorliegen einer AM zu untersuchen, wurden sympathische paravertebrale Ganglien in einem neuronalen Wachstumsassay mit PF von Frauen mit und ohne AM inkubiert und deren Neuritenaussprossung untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialübersicht

Geräte	Hersteller
Axiovert 40 CFL Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Binokular Wild M8	Wild Herbrugg, 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	Jane 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 90-L	Heraeus, Deutschland
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, Deutschland
Wärmebad	Medax, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Deckgläser "Cover glass", 24x50 mm
 Falcon Serologische Pipette, 5/10/25 ml
 Falcon Tubes, 15 ml
 Kryoröhrchen
 Lab-Tek Chamber slide system
 Mikrotom-Skalpelle
 Objektträger Super Frost Plus
 Petrischalen Nunclon Surface
 Pipettenspitzen
 Safe Seal Reagiergefäße, 2 ml
 Vakzine Lohmann Spezifiziert Pathogen
 Frei Eier (Valo SPF)

Hersteller

VWR International GmbH, Deutschland
 Becton Dickinson Labware, USA
 Becton Dickinson Labware, USA
 Nunc, Deutschland
 Nalge Nunc International, USA
 Feather, Japan
 Menzel, Deutschland
 Nunc, Dänemark
 Sarstedt, Deutschland
 Sarstedt, Deutschland
 Lohmann Tierzucht GmbH, Deutschland

Lösungen & Chemikalien

Antibody Diluent with Background
 Reducing Components
 Biotin Blocking System

Hersteller

Dako Corporation, USA
 Dako Corporation, USA

Citronensäure-Monohydrat	Merck KgaA, Deutschland
DAB + Substrate Buffer / DAB + Chromogen	Dako Corporation, USA
Dako Pen	Dako Corporation, USA
Dapi Fluoromount G	Southern Biotech, USA
DMEM/F-12	Invitrogen, Deutschland
Dulbecco's PBS 1x without Ca + Mg	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Ethanol 100%	Merck, Deutschland
Ethanol 96%	Merck, Deutschland
Ethanol 80%	Merck, Deutschland
Ethanol 70%	Merck, Deutschland
fetales Kälberserum	Biochrom, Deutschland
flüssiger Stickstoff	Linde, Deutschland
Formadleydlösung 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	Biochrom, Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck KgaA, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid), M = 58,44 g/mol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
NaOH (Natriumhydroxid) M = 40,00 g/mol	Merck KgaA, Deutschland
NGF 2,5S (0,1 ng/ml)	Sigma Aldrich, Deutschland
Paraformaldehydlösung	Merck, Deutschland
Paraplast Plus-Gewebeeinbettungsmedium	Leica Biosystems, USA
Peroxidase Blocking Reagent	Dako Corporation, USA

Serum Free Protein Block	Dako Corporation, USA
Streptavidin-AP (Alkalische Phosphatase)-conjugate	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Streptavidin/HRP (horseradish peroxidase)	Dako Corporation, USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KgaA, Deutschland
Triton-X-100-Lösung	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
TRIZMA® Base	Sigma Chemical Co., USA
TRIZMA® Hydrochlorid	Sigma Chemical Co., USA
Xylol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland

Puffer (1l)

Tris-Puffer (10x)

Zusammensetzung

68,5 g Tris-HCl (10mM)

8 g Tris-Base

87,8 g NaCl (150 mM)

mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt und
Einstellung auf pH 7,4-7,6 mit HCl/ NaOH

Citratpuffer (10mM, pH 6)

18 ml Lösung A

82 ml Lösung B

mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt

Lösung A

21,01 g Zitronensäure

mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt

Lösung B

29,41 g Natriumcitrat

mit Aqua dest. auf 1000ml aufgefüllt

Triton-X-100-Löung (0,2%)

200 µl Triton X

100 ml PBS

Software

Endnote X2

GraphPad Prism 4

Microsoft Office 2007

„Remote Capture“ Fotoprogramm

Hersteller

Thomson Research Software, USA

GraphPad Software, San Diego, USA

Microsoft Corporation, USA

Canon GmbH, Deutschland

2.2 Charakterisierung des Patientinnenkollektivs

2.2.1 Patientinnen für die immunhistochemische Analyse

Für die Analyse von uterinem Gewebe (Myometrium und Endometrium) wurden anhand von Patientenakten retrospektiv 61 Patientinnen mit und ohne AM ausgewählt. Die Patientinnen waren im Mittel $44,3 \pm 4,5$ Jahre alt (Spanne 34-57 Jahre) und wurden aufgrund von AM- bzw. EM-assoziierten Symptomen wie Dysmenorrhoe und Hypermenorrhoe oder aufgrund anderer gynäkologischer Beschwerden im Zeitraum von 1991 bis 2008 hysterektomiert. AM wurde histologisch gesichert. Nur prämenopausale Patientinnen wurden analysiert. Patientinnen mit malignen Tumoren und chronischen Entzündungen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Das Patientinnenkollektiv konnte in zwei Gruppen aufgeteilt werden. In der AM-Gruppe befanden sich 42 Frauen mit einem Durchschnittsalter von $45,8 \pm 4,9$ (Spanne 35-57 Jahre) und in der Kontrollgruppe (KG) 19 Frauen im Alter von $42,7 \pm 4,2$ Jahren (Spanne 34-49 Jahre).

Die Patientinnen wurden anhand ihrer Krankengeschichte nach der Art ihrer Beschwerden (Dysmenorrhoe, Unterbauchschmerzen oder keine Beschwerden) unterteilt. Ebenso wurde berücksichtigt, in welcher Zyklusphase sie sich befanden. Die jeweiligen Zyklusphasen wurden durch Angabe der letzten Menstruation errechnet und mittels histologischer Bewertung des Endometriums verifiziert. Innerhalb der AM-Gruppe gab es 15 Patientinnen, die mindestens zwei Monate vor der Operation Hormone eingenommen haben, und 27 Patientinnen ohne Hormoneinnahme. Innerhalb der KG standen 3 Patientinnen unter Hormontherapie, während 16 Patientinnen keine Hormone einnahmen. Des Weiteren wurde die Parität sowie die Gravidität und die mögliche Koinzidenz einer *Endometriosis genitalis externa* berücksichtigt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Patientinnenkollektiv für die immunhistochemische Analyse

		AM	KG
Anzahl		42	19
Alter		45,8 ± 4,9 (Spanne 35-57)	42,7 ± 4,2 (Spanne 34-49)
Hormoneinnahme	<i>Orale Kontrazeptiva</i>	10	3
	<i>GnRH-Analoga</i>	5	0
	<i>Keine Hormone</i>	27	16
Zyklus	<i>Menstruationsphase</i>	6	1
	<i>Proliferationsphase</i>	14	9
	<i>Sekretionsphase</i>	6	6
Schmerzen	<i>Ja</i>	19	8
	<i>Nein</i>	23	11
Gravidität	<i>Nulligravida</i>	7	5
	<i>Multigravida</i>	35	14
Parität	<i>Nullipara</i>	12	9
	<i>Multipara</i>	30	10
Koinzidenz einer EM		8	0

AM = Adenomyosegruppe; KG = Kontrollgruppe; EM = Endometriose

2.2.2 Patientinnen für das neuronale Wachstumsassay

Für die Analyse der Peritonealfüssigkeiten (PF) mittels neuronalem Wachstumsassay wurde anhand derselben Auswahlkriterien wie für die immunhistochemische Analyse ein Patientinnenkollektiv ausgewählt und in zwei Gruppen unterteilt (AM: n=5; KG: n=9). Die Patientinnen waren zwischen 19 und 51 Jahre alt (im Mittel $40,6 \pm 8,8$) und wurden ebenfalls wegen symptomatischer gynäkologischer Beschwerden im Zeitraum von 2008 bis 2010 in der Klinik für Gynäkologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin operiert. Patientinnen mit einer Koinzidenz von EM wurden in diesem Versuch ausgeschlossen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Patientinnenkollektiv für das neuronale Wachstumsassay

		AM	KG
Anzahl		5	9
Alter		$40,2 \pm 12,6$ (Spanne 19-51)	$41 \pm 4,9$ (Spanne 35-49)
Hormoneinnahme	<i>ja</i>	2	0
	<i>Nein</i>	3	9
Zyklus	<i>Menstruationsphase</i>	0	1
	<i>Proliferationsphase</i>	1	4
	<i>Sekretionsphase</i>	0	3
	<i>nicht bekannt</i>	4	1

AM = Adenomyosegruppe; KG = Kontrollgruppe

Die klinischen Patientendaten wurden im Endometriosezentrum Charité, Klinik für Gynäkologie mit Hochschulambulanz, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, erhoben. Die in dieser Studie untersuchten Proben wurden gemäß der Richtlinien der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin entnommen.

2.3 Materialgewinnung und Probenentnahme

2.3.1 Gewebeschnitte von Adenomyoseläsionen

Bei den untersuchten Proben handelt es sich um histologisch gesicherte AM-Präparate, die im Rahmen von laparoskopisch-assistierten vaginalen Hysterektomien gewonnen und direkt nach der Entnahme an die Pathologie übersandt wurden. Dort wurde das Gewebe in Formalin fixiert, entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Das Vorliegen einer AM wurde histologisch gesichert oder ausgeschlossen.

2.3.2 Peritonealflüssigkeit

Den Patientinnen wurde zu Beginn der Operation die Peritonealflüssigkeit (PF) entnommen und bei 3000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Kryoröhrchen überführt, danach sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nur klare, unverdünnte Flüssigkeiten wurden zur weiteren Analyse verwendet.

2.4 Immunhistochemische Färbung gegen die neuronalen Marker S 100, PGP 9.5, Tyrosinhydroxylase und Substanz P

Von den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom 1-2 µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Vor dem Anfärben mussten die Präparate vorbereitet werden. Die Schnitte wurden zum Trocknen zunächst ÜN bei 60°C inkubiert. Zum Entparaffinieren wurden die Präparate 2x für 10 min in Xylol getaucht. Zum Rehydrieren wurden sie anschließend in folgende Lösungen getaucht: 100%iges Ethanol (10 min), 100%iges Ethanol (5 min), dann in absteigende Konzentrationen von 96%, 80% und 70% Ethanol (je 5 min). Abschließend wurden die Schnitte für 10 min in 1x Tris-Puffer gelagert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 40 min in Citratpuffer im Dampfgerar gekocht. Somit konnte die

Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen und die Voraussetzung zur Anlagerung von Antikörpern geschaffen werden. Anschließend kühlten die Präparate 20 min ab. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte für 30 min bei RT mit fetalem Kälberserum (FCS) inkubiert. Die Schnitte der Färbung gegen PGP 9.5 wurden vorab mit dem *Avidin-Biotin-Blocking-System* behandelt.

Für den Nachweis der NF wurden folgende Primärantikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie (IHC)

Antikörper	Verdünnung	gerichtet gegen Spezies	Hersteller
Monoklonal Maus Anti-Tyrosinhydroxylase	1: 500	Mensch	abcam, UK
Polyklonal Ziege Anti-Substanz P	1:200	Mensch	Santa Cruz Biotech., USA
Polyklonal Kaninchen Anti- S100	1:400	Mensch	Dako, Dänemark
Polyklonal Kaninchen Anti-PGP 9.5	1:600	Mensch	Dako, Dänemark

Die verwendeten Antikörper wurden mit *Antibody Diluent* verdünnt und die Lösung mit einem Vortexgerät durchgemischt. Der optimale Verdünnungsgrad ist vorher in Färbereihen mit verschiedenen Verdünnungen bestimmt worden. Die Präparate wurden mit dem primären Antikörper für 1 Std bei RT im geschlossenen Färbekasten inkubiert. Danach wurden sie mit 1x Tris gespült und der sekundäre Antikörper wurde für 40 min aufgetragen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper für IHC

Antikörper	Verdünnung	gerichtet gegen Primär-AK	Hersteller
Biotin-SP-konjugiertes Maus Anti-Kaninchen IgG	1:400	Kaninchen	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Biotin-SP-konjugiertes Kaninchen Anti-Ziege IgG	1:400	Ziege	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK
Biotin-SP-konjugiertes Kaninchen Anti-Maus IgG	1:400	Maus	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK

Daraufhin wurden die Präparate mit Alkalische Phosphatase (AP)-konjugiertem Streptavidin für 40 min inkubiert und konnten anschließend mit dem *Fuchsin-Substrate-Chromogen-System* für 15 min angefärbt werden. Zwischen jedem Färbeschritt mussten die Präparate mit 1x Tris-Puffer gespült werden. Im Anschluss an eine 35 Sekunden lange Kernfärbung mit Hämalaun wurden die Schnitte unter laufendem *Aqua dest.* für 10 min gespült und abschließend mit erwärmter Glyceringelatine und Deckgläsern eingedeckelt.

Bei jedem einzelnen Färbedurchgang wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde bei den Negativkontrollen der Primärantikörper durch Tris-Puffer ersetzt. Für die Positivkontrollen der PGP 9.5-, S100- und TH-Färbungen wurden Gewebeschnitte von gesundem Darm mitgefärbt. Bei der SP-Färbung wurde zwecks Positivkontrolle gesunde Haut bzw. Vorhaut eingesetzt.

2.5 Immunhistochemische Doppelfärbung gegen Tyrosinhydroxylase und Östrogenrezeptor α bzw. β

Für die Doppelfärbung von jeweils 10 Präparaten wurden diese zunächst genauso vorbereitet wie für die Einfachfärbung. Um jedoch unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Schnitte nach dem Kochvorgang im Dampfgerar zunächst mit Peroxidase Block für 10 min inkubiert. Der weitere Ablauf einschließlich der

Anfärbung mit dem *Fuchsin-Substrate-Chromogen-System* gleicht dem der Einfachfärbung von Tyrosinhydroxylase (siehe Abschnitt 2.4). Anschließend wurden die Präparate mit *Aqua dest.* gespült und mit *Antibody Diluent* für 10 min geblockt. Dann wurde der zweite primäre Antikörper (Östrogenrezeptor α bzw. β) für 1 Std aufgetragen (siehe Tabelle 5). Im Anschluss wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für 40 min inkubiert (siehe Tabelle 6). Daraufhin wurden die Präparate mit Streptavidin/HRP für 40 min inkubiert und konnten anschließend mit dem DAB + Substrate Buffer / DAB + Chromogen für 3-10 min angefärbt werden (je nach Dauer bis zum Farbumschlag unter dem Mikroskop). Zum Abschluss wurden die Präparate gründlich mit *Aqua dest.* gespült und konnten durch eine 35 Sekunden dauernde Kernfärbung mit Hämalaun angefärbt werden.

Auch bei dieser Färbung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde bei den Negativkontrollen der Primärantikörper durch 1x Tris-Puffer ersetzt. Für die Positivkontrollen wurden Gewebeschnitte von gesundem Ovar oder Medulla oblongata eingesetzt.

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für die IHC-Doppelfärbung

Antikörper	Verdünnung	gerichtet gegen Spezies	Hersteller
Monoklonal Maus Anti-Tyrosinhydroxylase	1: 250	Mensch	abcam, UK
Monoklonal Maus Anti-Östrogenrezeptor α	1:35	Mensch	Dako Corporation, USA
Monoklonal Kaninchen Anti-Östrogenrezeptor β	1:50	Mensch	Epitomics Inc., USA

Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für die IHC-Doppelfärbung

Antikörper	Verdünnung	gerichtet gegen Primär-AK	Hersteller
Biotin-SP-konjugiertes IgG	1:400	Maus	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK

2.6 Auswertung der Nervenfaserdichte

2.6.1 Immunhistochemische Färbung gegen S 100, PGP 9.5, Tyrosinhydroxylase und Substanz P

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop in unterschiedlichen Vergrößerungen (2,5x, 20x, 40x, 100x) (x 10) analysiert. Die Präparate wurden mindestens zweimal zeitlich versetzt voneinander begutachtet und bewertet. Dabei wurde das Vorkommen von NF für die folgenden anatomischen Schichten untersucht:

- Endometrium mit Stratum functionale und basale
- Junktionalzone zwischen Endometrium und Myometrium
- Myometrium
- Läsion

Für den Nervenfasernachweis im Endometrium, der Junktionalzone und der Läsion wurde an jeweils zwei Stellen die Anzahl der positiv angefärbten NF in der 20 fachen Vergrößerung ermittelt, die einer Fläche von 1 mm² entspricht. Daraus wurde für die statistische Analyse ein Mittelwert gebildet. Für das Myometrium wurde die Nervenfaserdichte/mm² mittels der sogenannten Hot-Spot-Methode nach Weidner (Weidner et al. 1991) ausgewertet, bei der für eine Fläche von 1mm² (x 20) die Stelle mit den meisten NF („hot spot“) ermittelt und ausgezählt wurde.

2.6.2 Auswertung der Doppelfärbung gegen TH und Östrogenrezeptor α und β

Um zu untersuchen, ob sympathische NF mit den Östrogenrezeptoren (ER) α und β kolokalisieren, wurde an jeweils 10 Präparaten aus beiden Patientengruppen eine immunhistochemische Doppelfärbung durchgeführt. Sympathische Nerven (rot angefärbt) wurden auf die Expression von ER α bzw. ER β (braun angefärbt) überprüft. Die Anzahl der TH-positiven sympathischen NF wurde ausgezählt, die mit ER α oder ER β kolokalisieren.

2.7 Neuronales *In-Vitro*-Wachstumsassay

Mithilfe dieser Methode konnte die Neuritenausprossung von sympathischen paravertebralen Ganglien aus 8-9 Tage alten Hühnerembryonen untersucht werden, welche mit PF von Frauen mit und ohne AM inkubiert wurden. Nach 48 Std konnte die Nervenaustrittsstelle ausgewertet werden. Die Ganglien wurden anschließend mit TH und *Growth-Associated Protein 43* (GAP 43) angefärbt.

2.7.1 Lagerung und Bebrütung der Eier

Die befruchteten Eier wurden zwischen Lieferung und Bebrüten – falls nötig – in einem Kühlschrank bei 14°C aufbewahrt. Dann wurden sie in einer Brutmaschine mit motorisierter Eierwendung bei einer Luftfeuchtigkeit von ungefähr 60% bei 37°C für 8-9 Tage angebrütet.

2.7.2 Präparation der sympathischen paravertebralen Ganglien

Die Eier wurden mit Alkohol desinfiziert und dann mit einer großen Pinzette am runden Ende eröffnet, da sich auf dieser Seite die Luftblase befindet. Die Hühnerembryonen konnten dann mit einer gebogenen Pinzette herausgenommen und in eine mit kaltem PBS gefüllte Petrischale gelegt werden. Dort wurden sie sofort

mit einer Schere dekapitiert. Der Körper wurde dann in eine frische Schale mit kaltem PBS gelegt, um die sympathischen Ganglien unter dem Binokular herauszupräparieren. Die Hühnerembryonenkörper wurden von ventral eröffnet, um die Organe zu entfernen und die Wirbelsäule frei zu präparieren. Den Grenzstrang erkennt man als eine Kette untereinander in Längsrichtung verbundener sympathischer Ganglien jeweils rechts und links vor den Wirbelkörpern des Rumpfes. Die Ganglien wurden an einem Strang mit einer sehr feinen und spitzen Pinzette entfernt und in einer mit PBS gefüllten Petrischale gesammelt. Dort wurden sie von eventuell verbliebenen Nervenstümpfen und Bindegewebsresten befreit.

2.7.3 Versuchsaufbau

In jede Kammer eines achtkammerigen *Lab-Tek® Chamber Slide™ Systems* wurden mehrere Ganglien des sympathischen Grenzstrangs gelegt. Um eine bessere Haftung der Ganglien zu gewährleisten, mussten die Platten am Tag zuvor entsprechend vorbereitet werden. Sie wurden mit Kollagen IV (Verdünnung 1:50 mit sterilem PBS) ÜN im Kühlschrank inkubiert. Das Kollagen setzte sich am Boden der Kammer ab, die verbleibende Lösung wurde am Versuchstag abgesaugt und die Kammer wurde dreimal mit sterilem PBS gespült. Die Kammern wurden mit je 125 µl PF und 125 µl *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) befüllt. Für die Negativkontrolle wurde nur DMEM verwendet und für die Positivkontrolle DMEM mit 0,1 ng/ml *Nerve Growth Factor-2.5S*. Die Ganglien konnten nun dazugegeben werden und wurden für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung kultiviert. Jede PF wurde in mindestens zwei unabhängigen Versuchen getestet, so dass ein Mittelwert errechnet werden konnte. Anschließend wurden die Ganglien am Mikroskop bezüglich ihrer Neuritenaussprossung bewertet und fotografiert. Die Ganglien wurden auf einer Skala von 0 bis 3 beurteilt. Dabei steht 0 für keine Aussprossung, 1 für vereinzelte Neuriten, 2 für eine Aussprossung von mehr als einem Viertel des Gangliendurchmessers und 3 für eine Aussprossung von mehr als der Hälfte des Gangliendurchmessers.

2.7.4 Immunfluoreszenzfärbung der paravertebralen Ganglien

In regenerierenden oder sich neu ausbildenden NF wird *Growth-Associated Protein* (GAP 43) exprimiert (Bolden et al. 1997; Ferretti et al. 2003). Um nachweisen zu können, dass es sich bei der Neuritenausprossung um sich neu ausgebildete sympathische Neuriten handelt, wurden die Ganglien mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen GAP 43 und TH angefärbt. Die Kammern wurden dazu vorsichtig durch Abkippen der Versuchsmedien entleert und zweimal mit PBS gespült. Daraufhin wurden sie zunächst für 8 min mit 200 µl einer 4%igen Paraformaldehydlösung inkubiert, mit PBS gewaschen und dann für 10 min mit 200 µl 0,2%iger *Triton-X-100-Lösung* inkubiert, um die Zellmembran für die Antikörper permeabel zu machen. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen FCS für 30 min bei RT aufgetragen. Dann wurden sie mit den entsprechenden Antikörpern benetzt: Der Primärantikörper (siehe Tabelle 7) wurde für 1 Std bei RT aufgetragen und daraufhin wurde der Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8) ebenfalls für 1 Std bei RT aufgetragen. Anschließend wurden die Ganglien zweimal mit 1x Tris-Puffer gespült, mit *Dapi Fluoromount G* kerngefärbt und anschließend eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop und wurde fotografisch festgehalten.

Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgefärbt, bei der anstelle des Primärantikörpers reines PBS aufgetragen wurde. Alle Antikörper wurden mit *Antibody Diluent* verdünnt und vor dem Auftragen mit dem Vortexgerät gemischt.

Tabelle 7: Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paraventralen Ganglien

Antikörper	Verdünnung	gerichtet gegen Spezies	Hersteller
Monoklonal Maus Anti-GAP 43	1: 200	Mensch	Sigma Chemical Co., USA
Monoklonal Maus Anti-Tyrosinhydroxylase	1:500	Mensch	abcam, UK

Tabelle 8: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paraventralen Ganglien

Antikörper	Verdünnung	gerichtet gegen Primär-AK	Hersteller
Rhodamine Red X-konjugiertes Esel Anti-Maus IgG	1:100	Maus	Dianova, Hamburg
Cy2-konjugiertes Esel Anti- Maus IgG	1:100	Maus	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., UK

2.8 Statistische Auswertung

Die von der immunhistochemischen Analyse bzw. dem neuronalen Wachstumsassay gewonnenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 4 für Windows analysiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Dabei wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse oder die Two Way Anova genutzt. Waren die Werte nicht normal verteilt, wurde der nicht-parametrische Test (Mann Whitney Test) angewandt. Der parametrische Test (T-Test) wurde bei einer Normalverteilung der Werte verwendet. Die Mittelwerte wurden mithilfe des Dunnett's Tests verglichen. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$) festgelegt. Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 7% ($p < 0,07$) wurden als Tendenz betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen Nervenfasern in den unterschiedlichen anatomischen uterinen Schichten von Frauen mit und ohne AM

Die immunhistochemisch angefärbten Gewebsschnitte der Uteri wurden in Bezug auf die Dichte von NF statistisch ausgewertet. Mit allen vier verwendeten Markern (PGP 9.5, S 100, TH und Sub P) konnten im uterinen Gewebe von Frauen sowohl mit als auch ohne AM myelinisierte, intakte myelinisierte und unmyelinisierte, sympathische und sensible NF dargestellt werden (siehe Abbildung 8).

Die NF-Dichte wurde mit jedem Marker einzeln betrachtet und ausgewertet. Die unterschiedlichen Arten von NF stellten sich bezüglich ihrer Verteilung im Myometrium folgendermaßen dar: Die Präparate der AM- als auch die der Kontrollgruppe, die S 100-positive NF (Marker für myelinisierte NF) darstellten, erreichten die höchste Nervenfaserdichte (AM $3,9 \pm 2,9/\text{mm}^2$; KG $4,6 \pm 2,7/\text{mm}^2$ im Myometrium). Eine geringere Nervenfaserdichte konnte in den Präparaten, die PGP 9.5-positive NF (Marker für intakte myelinisierte und unmyelinisierte NF; AM $2,1 \pm 1,3/\text{mm}^2$; KG $2,8 \pm 1,5/\text{mm}^2$ im Myometrium) und TH-positive NF (Marker für sympathische NF; AM $1,5 \pm 1,5/\text{mm}^2$; KG $3,3 \pm 2,4/\text{mm}^2$ im Myometrium) darstellten, ausgewertet werden. In den Präparaten, die Substanz P-positive NF (Marker für sensible NF) darstellten, war die geringste Nervenfaserdichte (AM $0,5 \pm 0,8/\text{mm}^2$; KG $0,8 \pm 0,9/\text{mm}^2$ im Myometrium) nachweisbar. Eine Übersicht der verwendeten Marker ist in Tabelle 9 dargestellt.

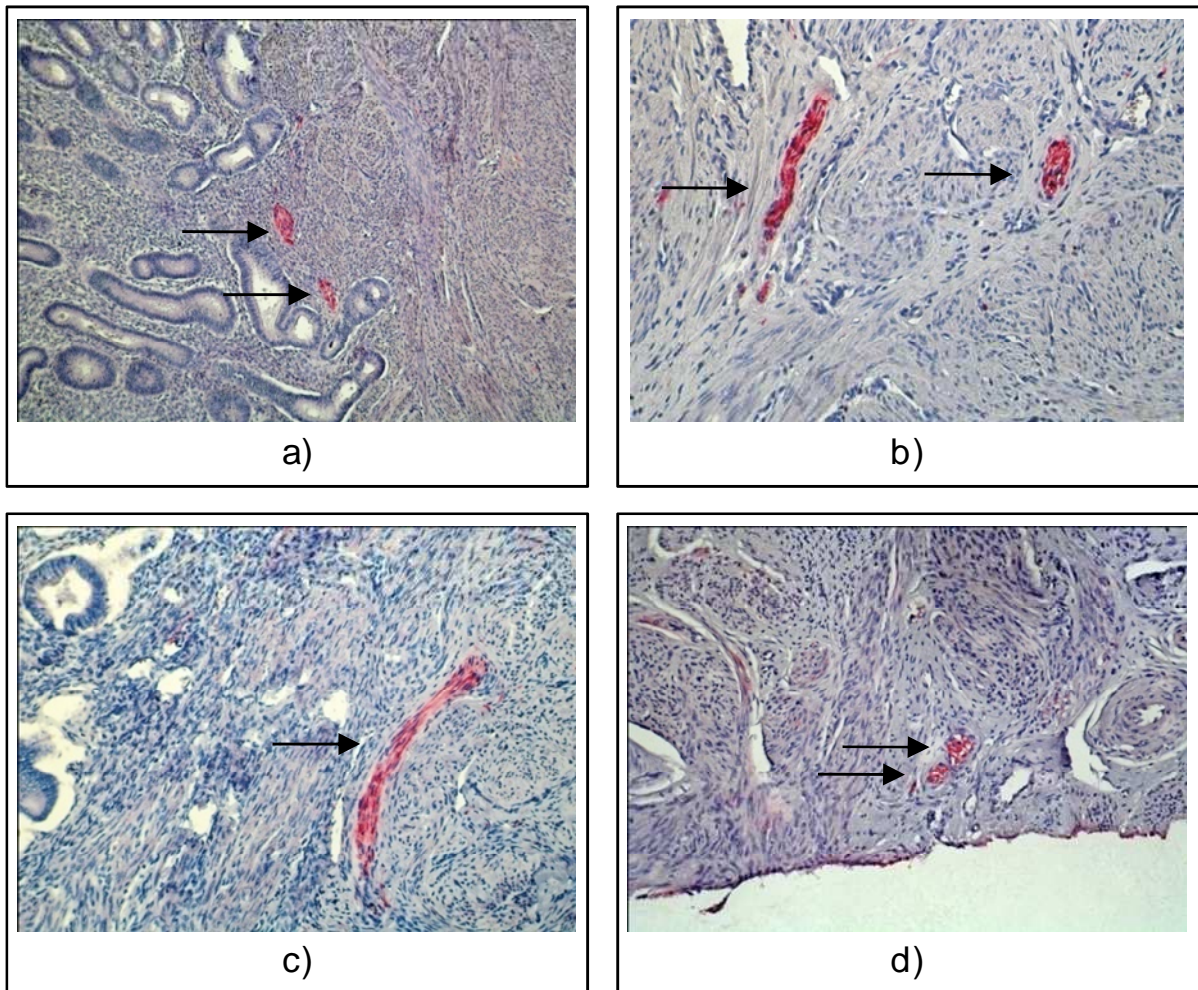


Abbildung 8: NF im uterinen Gewebe von Frauen mit und ohne AM

a) PGP 9.5-positive NF in der Junktionalzone einer Patientin mit AM, Vergrößerung 10x10; b) S 100-positive NF im Myometrium einer Patientin mit AM, Vergrößerung 20x10; c) TH-positive NF in der Junktionalzone einer Patientin der KG, Vergrößerung 20x10; d) Sub P-positive NF im Myometrium einer Patientin der KG, Vergrößerung 20x10. Die schwarzen Pfeile zeigen NF. NF= Nervenfasern; AM= Adenomyose; KG= Kontrollgruppe

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Marker. NF= Nervenfasern

Marker	exprimiert in
Protein Gen Produkt 9.5 (PGP 9.5)	myelinisierte und unmyelinisierte intakte NF
S 100	myelinisierte NF
Tyrosinhydroxylase (TH)	sympathische NF
Substanz P (Sub P)	sensible NF (A δ - und C-Fasern)

3.1.1 Vergleich der Nervenfaserdichte in den unterschiedlichen anatomischen Schichten des uterinen Gewebes

Die einzelnen anatomischen Schichten wurden im Weiteren getrennt voneinander untersucht und analysiert. Dabei wurde jeder Marker einzeln betrachtet und ausgewertet. Ein Überblick der Schichten ist in Abbildung 9 dargestellt. In Tabelle 10 ist eine Übersicht über die NF-Dichte pro mm² im Patientinnenkollektiv bezogen auf die verwendeten Marker und die ausgewerteten anatomischen Schichten in AM- und Kontrollgruppe dargestellt.

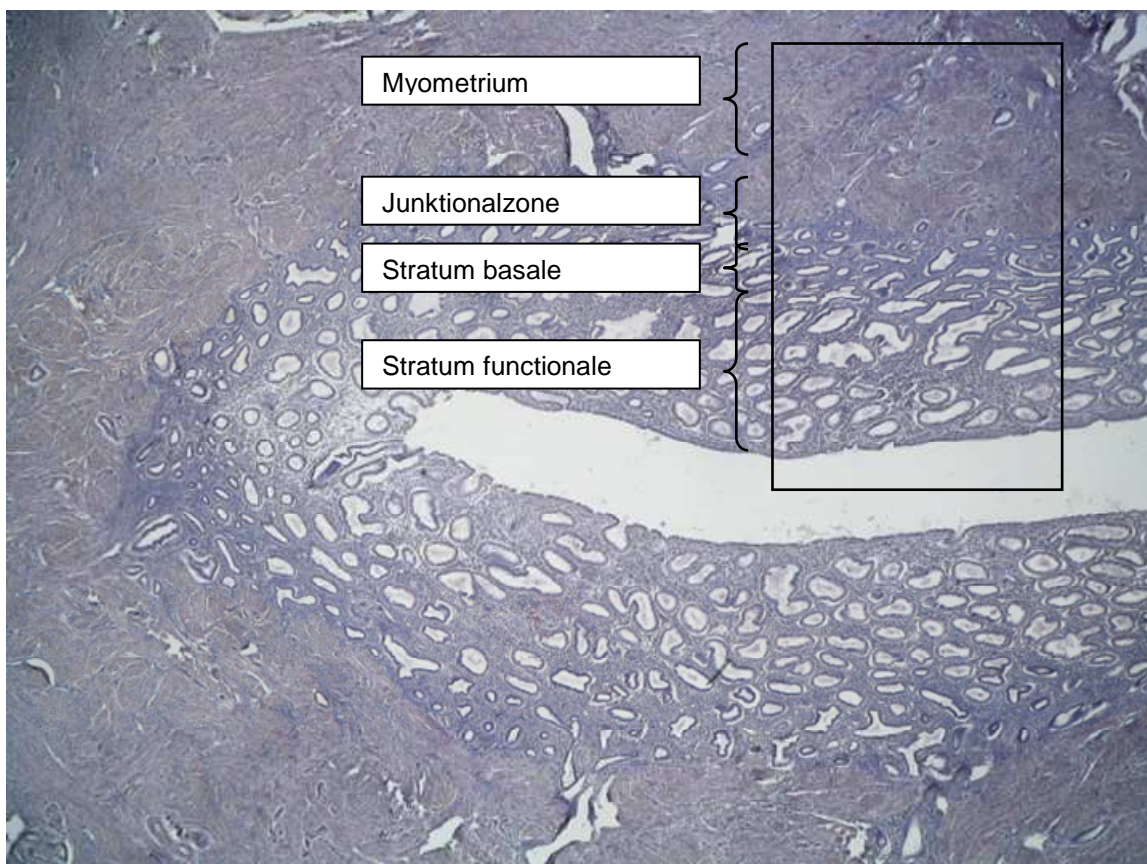


Abbildung 9: Histologische Darstellung von Myometrium und Endometrium

Stratum functionale, Stratum basale sowie die Junktionalzone mit angrenzendem Myometrium (25x Vergrößerung), HE Färbung

Tabelle 10: NF-Dichte / mm² im Patientinnenkollektiv bezogen auf die anatomischen Schichten

Marker	Myometrium	Junktionalzone	Stratum basale	Stratum functionale
PGP 9.5	KG: 2,8 ± 1,5/mm ²	KG: 0,2 ± 0,4/mm ²	KG: 0,3 ± 0,7/mm ²	KG: 0,0 ± 0,0/mm ²
	AM: 2,1 ± 1,3/mm ²	AM: 0,1 ± 0,2/mm ²	AM: 0,2 ± 0,9/mm ²	AM: 0,0 ± 0,0/mm ²
S 100	KG: 4,6 ± 2,7/mm ²	KG: 1,6 ± 1,9/mm ²	KG: 1,0 ± 1,7/mm ²	KG: 0,0 ± 0,0/mm ²
	AM: 3,9 ± 3,0/mm ²	AM: 0,5 ± 0,7/mm ²	AM: 0,6 ± 1,1/mm ²	AM: 0,1 ± 0,5/mm ²
TH	KG: 3,3 ± 2,4/mm ² ***	AM: 0,5 ± 1,4/mm ²	AM: 0,3 ± 1,1/mm ²	AM: 0,0 ± 0,0/mm ²
	AM: 1,5 ± 1,5/mm ² ***	KG: 0,0 ± 0,2/mm ²	KG: 0,1 ± 0,4/mm ²	KG: 0,0 ± 0,0/mm ²
Sub P	KG: 0,8 ± 0,9/mm ²	AM: 0,1 ± 0,2/mm ²	AM: 0,1 ± 0,4/mm ²	AM: 0,0 ± 0,0/mm ²
	AM: 0,5 ± 0,8/mm ²	KG: 0,0 ± 0,1/mm ²	KG: 0,0 ± 0,1/mm ²	KG: 0,0 ± 0,0/mm ²

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19; AM: n=42.

*** p<0,001

3.1.1.1 Nervenfaserdichte im Myometrium

Mit allen vier Markern konnten im Myometrium beider Gruppen NF nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10). Die Auswertung der Nervenfaserdichte im Myometrium von Patientinnen mit und ohne AM zeigte, dass das Vorkommen von S100-, PGP 9.5- und Substanz P-positiven NF bei Patientinnen mit AM gegenüber der KG vermindert ist, jedoch ist diese Beobachtung nicht signifikant (Mann Whithney Test, p>0,05; siehe Abbildung 10). Auffällig war hingegen ein signifikant vermindertes Vorkommen von TH-positiven sympathischen NF in der AM-Gruppe (T-Test: ***p < 0,001; KG: 3,3 ± 2,4 NF/mm²; AM: 1,5 ± 1,5 NF/mm²; siehe Abbildung 10).

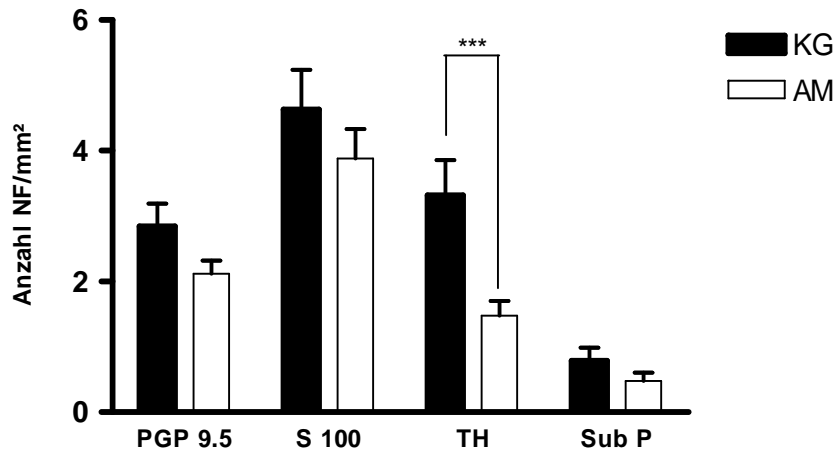


Abbildung 10: Verminderte NF-Dichte im Myometrium bei Patientinnen mit AM im Vergleich zur KG

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der PGP 9.5-, S100-, TH-, und Sub P- positiven NF-Dichte. NF= Nervenfasern; KG = Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19; AM: n=42; ***p< 0,001

3.1.1.2 Nervenfaserdichte in der Junktionalzone und im Endometrium

Bei der Auswertung der einzelnen anatomischen Schichten des Uterus ließen sich mit allen vier verwendeten Markern die meisten NF im Myometrium nachweisen, unabhängig davon, ob es sich um Frauen mit oder ohne AM handelte. Im Übergang vom Myometrium zum Stratum basale des Endometriums, der sogenannten Junktionalzone, ließen sich bereits deutlich weniger PGP 9.5-, S 100-, TH- und Sub P-positive NF darstellen und vor allem im Stratum basale waren nur noch bei vereinzelt Präparaten PGP 9.5-, S 100-, TH- und Sub P-positive NF nachweisbar. Im Stratum functionale ließen sich lediglich mit dem Panmarker S 100 schwache positive Signale nachweisen (siehe Abbildung 11-8). Die Abbildungen 5-8 zeigen, dass das Endometrium im Vergleich zum Myometrium von Frauen sowohl mit als auch ohne AM signifikant reduziert innerviert ist (siehe Abbildung 11-8; Mann Whitney Test; ***p<0,0001; **p<0,01).

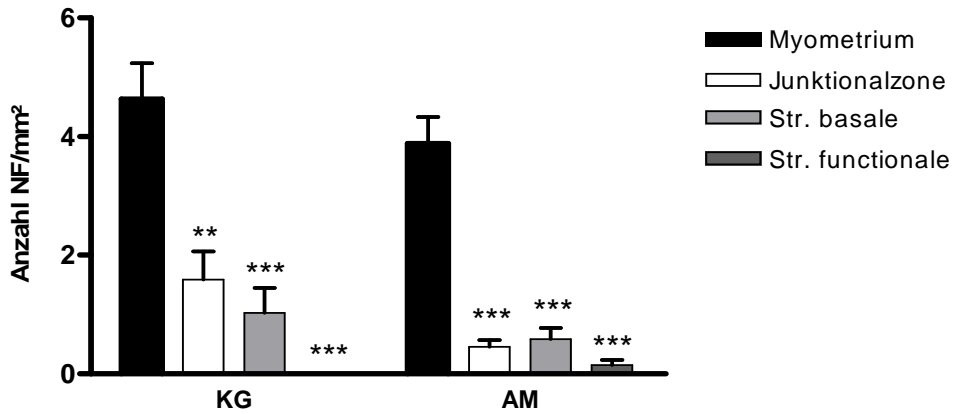


Abbildung 11: S 100-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19, AM: n=42; **p< 0,01; ***p< 0,0001

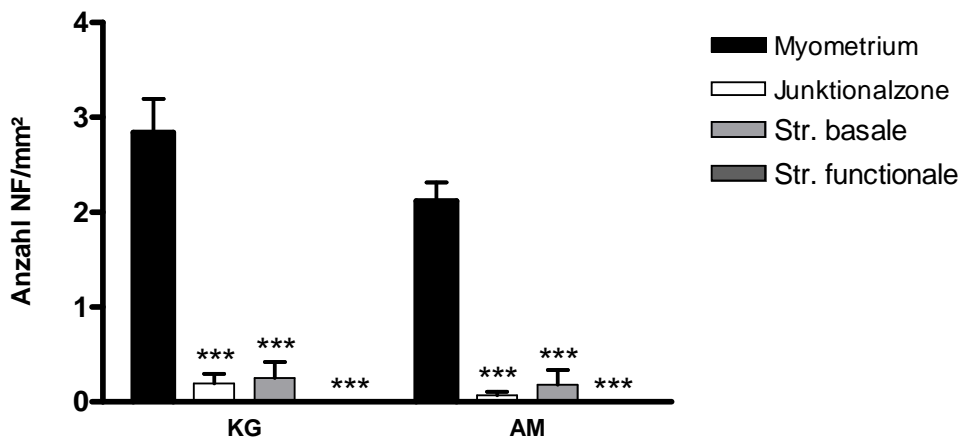


Abbildung 12: PGP 9.5-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19, AM: n=42; ***p< 0,0001

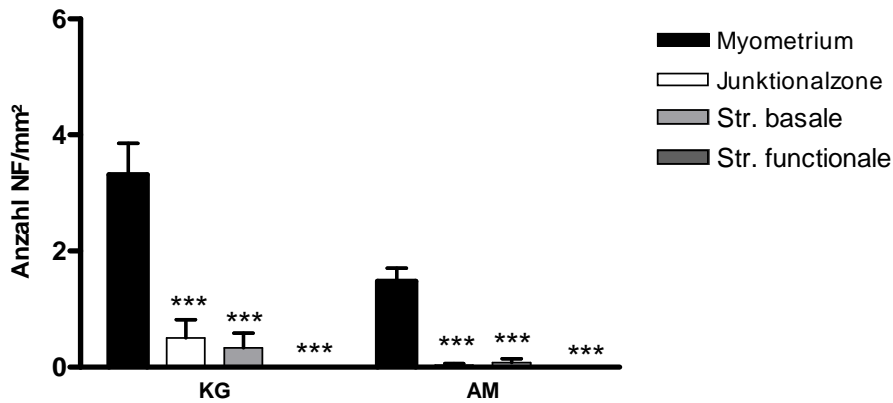


Abbildung 13: TH-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19, AM: n=42; ***p< 0,0001

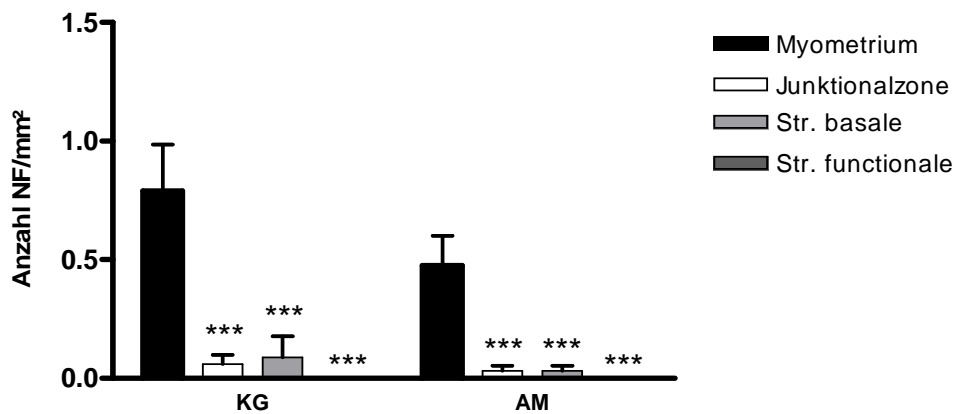


Abbildung 14: Substanz P-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19, AM: n=42; ***p< 0,0001

3.1.2 Nervenfaserdichte innerhalb der AM-Läsion

Innerhalb der Läsionen sowie im unmittelbar angrenzenden Myometrium konnten mit allen verwendeten Markern nahezu keine NF dargestellt werden (siehe Abbildung 15 und Tabelle 11). Lediglich in einigen wenigen Präparaten ließen sich positive Signale in Läsionsnähe nachweisen.

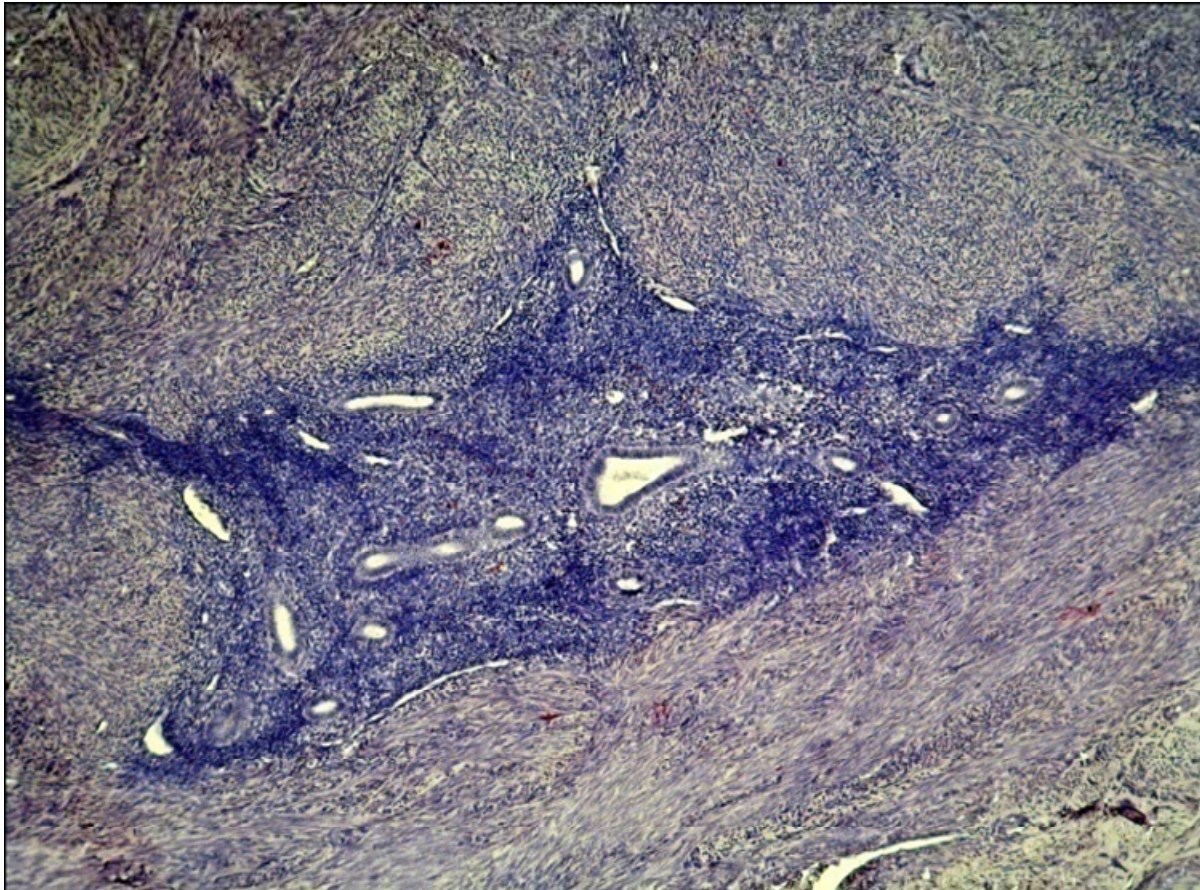


Abbildung 15: Histologische Darstellung einer typischen adenomyotischen Läsion mit endometrialen Drüsen und Stromazellen im Myometrium

2,5x10fache Vergrößerung, Tyrosinhydroxylase-Färbung

Tabelle 11: NF-Dichte pro mm² in der Läsion und in Läsionsnähe einer AM-Patientin.

Marker	NF-Dichte in der AM-Läsion (n = 42)	Anzahl der Präparate mit NF
PGP 9.5	0,1 ± 0,2/mm ²	4 von 42
S 100	0,4 ± 0,8/mm ²	11 von 42
TH	0,0 ± 0,2/mm ²	3 von 42
Sub P	0,0 ± 0,0/mm ²	0 von 42

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung der NF-Dichte sowie die Anzahl der Präparate mit NF. NF= Nervenfasern; AM= Adenomyose

3.1.3 Nervenfaserdichte in Bezug auf die Zyklusphasen im Myometrium von Patientinnen mit und ohne AM

Um eine mögliche Korrelation zwischen den einzelnen Zyklusphasen und der Nervenfaserdichte im Myometrium zu analysieren, wurden diese innerhalb der Gruppen miteinander verglichen. Jeder Marker wurde dazu einzeln betrachtet und ausgewertet (siehe Tabelle 12). Die Dichte intakter myelinisierter und unmyelinisierter PGP 9.5-positiver NF variierte dabei nicht während der verschiedenen Zyklusphasen, weder in der AM- noch in der Kontrollgruppe ($p > 0,05$; T-Test, siehe Tabelle 12). Auch die Dichte myelinisierter S100- und sensibler Sub P-positiver NF veränderte sich in beiden Gruppen nicht in Bezug auf die Zyklusphasen ($p > 0,05$, siehe Tabelle 12). Allerdings zeigte die Auswertung der sympathischen TH-positiven NF eine tendenziell verminderte Innervation innerhalb der KG während der sekretorischen Phase im Vergleich zur proliferativen Phase ($p=0,07$, T-Test, siehe Abbildung 16). Interessanterweise ließen sich im Gegensatz dazu innerhalb der AM-Gruppe keine zyklusbedingten Unterschiede bezüglich der Anzahl der sympathischen NF feststellen ($p > 0,05$, T-Test, siehe Abbildung 16).

Bei der Betrachtung der proliferativen Phase konnten Unterschiede zwischen AM- und Kontrollgruppe festgestellt werden. In der AM-Gruppe war die Anzahl TH-positiver sympathischer NF in der proliferativen Phase signifikant reduziert im Vergleich zur KG (** $p < 0,01$, Unpaired T-Test, siehe Abbildung 16). Allerdings konnte eine ähnliche Reduktion sympathischer NF während der sekretorischen Phase in beiden Gruppen nicht beobachtet werden ($p > 0,05$, T-Test, siehe Abbildung 16).

Tabelle 12: NF-Dichte pro mm² im Patientenkollektiv bezogen auf die Zyklusphasen

Marker	menstruelle Phase	proliferative Phase	sekretorische Phase
	KG (n=1); AM (n=6)	KG (n=9); AM (n=14)	KG (n=6); AM (n=6)
PGP 9.5	KG: 2,0 ± 0,0 /mm ²	KG: 2,7 ± 1,7 /mm ²	KG: 3,3 ± 1,2 /mm ²
	AM: 2,7 ± 1,6 /mm ²	AM: 1,9 ± 1,1 /mm ²	AM: 3,0 ± 1,3 /mm ²
S 100	KG: 9,0 ± 0,0 /mm ²	KG: 4,7 ± 2,7 /mm ²	KG: 5,0 ± 2,0 /mm ²
	AM: 5,0 ± 4,5 /mm ²	AM: 4,1 ± 3,2 /mm ²	AM: 5,2 ± 2,2 /mm ²
TH	KG: 3,0 ± 0,0 /mm ²	KG: 4,7 ± 2,3 /mm ² **	KG: 2,5 ± 1,8 /mm ²
	AM: 1,5 ± 1,0 /mm ²	AM: 2,1 ± 1,8 /mm ² **	AM: 1,3 ± 1,0 /mm ²
Sub P	KG: 1,0 ± 0,0 /mm ²	KG: 1,0 ± 1,0 /mm ²	KG: 0,8 ± 0,8 /mm ²
	AM: 0,8 ± 1,6 /mm ²	AM: 0,3 ± 0,5 /mm ²	AM: 0,5 ± 0,5 /mm ²

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; KG: n=19; AM: n=42

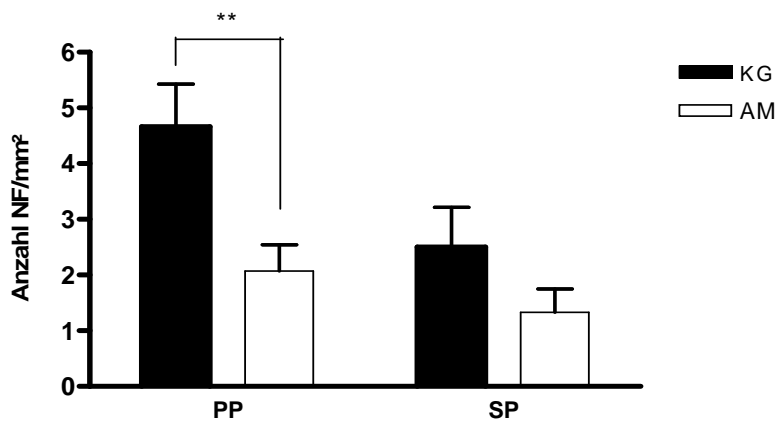


Abbildung 16: Anzahl TH-positiver NF im Myometrium von Frauen mit und ohne AM

Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung der sympathischen NF-Dichte in der proliferativen (PP) und sekretorischen (SP) Phase des Zyklus. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; **p< 0,01

3.1.4 Nervenfaserdichte und Korrelation zum Hormonstatus im Myometrium von Patientinnen mit und ohne AM

In Bezug auf den Hormonstatus sollte überprüft werden, ob die Einnahme von Hormonen möglicherweise einen Einfluss auf die Nervenfaserdichte im Myometrium hat. Alle Marker wurden einzeln betrachtet und ausgewertet. Zunächst wurden die AM-Patientinnen in drei Gruppen (Orale Kontrazeptiva; GnRH-Analoga; keine Hormone) unterteilt und miteinander verglichen. Dann wurden die Patientinnen aus der KG gleichermaßen unterteilt und verglichen. Innerhalb der AM-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl PGP 9.5-, S 100-, TH- und Sub P-positiver NF im Myometrium in Bezug auf den Hormonstatus (siehe Tabelle 13; $p > 0,05$, Mann Whitney Test). Bei den Patientinnen der KG gab es ebenfalls keine Veränderung in der Dichte von PGP 9.5-, S 100- und Sub P-positiven NF. Es zeigte sich jedoch bei der Auswertung der sympathischen TH-positiven NF innerhalb der KG die Tendenz ($p = 0,06$; Mann Whitney Test) zu verminderter Nervenfaseraussprossung bei Patientinnen, die orale Kontrazeptiva nahmen (siehe Abbildung 17).

Tabelle 13: NF-Dichte pro mm^2 im Patientinnenkollektiv bezogen auf den Hormonstatus

Marker	Orale Kontrazeptiva	GnRH-Analoga	keine Hormone
	KG (n=3); AM (n=10)	KG (n=0); AM (n=5)	KG (n=16); AM (n=27)
PGP 9.5	KG: $2,7 \pm 2,0 / \text{mm}^2$		KG: $2,9 \pm 1,5 / \text{mm}^2$
	AM: $1,5 \pm 1,2 / \text{mm}^2$	AM: $2,2 \pm 0,8 / \text{mm}$	AM: $2,3 \pm 1,3 / \text{mm}^2$
S 100	KG: $2,3 \pm 2,3 / \text{mm}^2$		KG: $5,1 \pm 2,5 / \text{mm}^2$
	AM: $2,9 \pm 2,0 / \text{mm}^2$	AM: $2,6 \pm 2,1 / \text{mm}$	AM: $4,5 \pm 3,3 / \text{mm}^2$
TH	KG: $1,0 \pm 1,8 / \text{mm}^2$		KG: $3,8 \pm 2,2 / \text{mm}^2$
	AM: $1,3 \pm 1,5 / \text{mm}^2$	AM: $0,4 \pm 0,9 / \text{mm}$	AM: $1,8 \pm 1,5 / \text{mm}^2$
Sub P	KG: $0,0 \pm 0,0 / \text{mm}^2$		KG: $0,9 \pm 0,9 / \text{mm}^2$
	AM: $0,4 \pm 0,7 / \text{mm}^2$	AM: $0,8 \pm 0,8 / \text{mm}$	AM: $0,5 \pm 0,9 / \text{mm}^2$

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe,

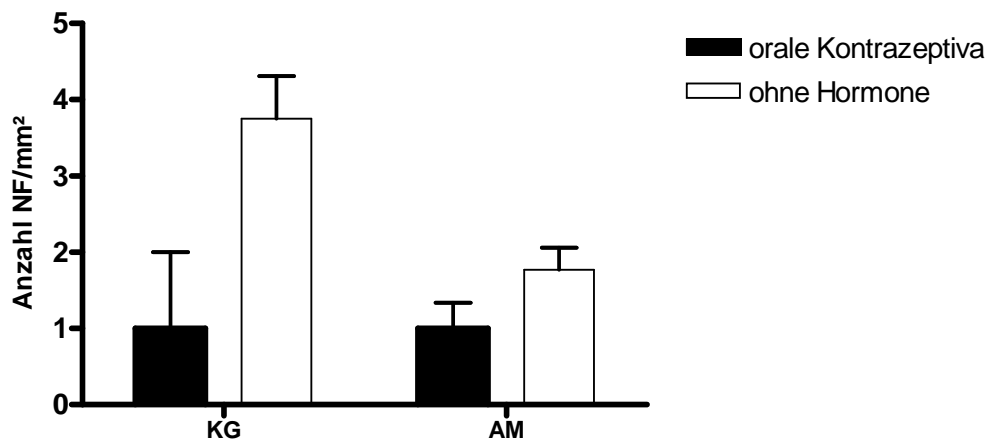


Abbildung 17: Anzahl TH-positiver NF im Myometrium von Frauen mit und ohne AM

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der sympathischen NF-Dichte bei Patientinnen mit und ohne Hormoneinnahme. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe.

3.1.5 Nervenfaserdichte in Abhängigkeit von der Schmerzsymptomatik im Myometrium von Frauen mit und ohne AM

Das Patientinnenkollektiv wurde in Bezug auf unterschiedliche Schmerzqualitäten eingeteilt. Aufgrund der retrospektiven Dokumentation ohne Angabe der Schmerzintensität wurden die Patientinnen lediglich nach dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von Schmerzen in eine Schmerz- und eine Nicht-Schmerz-Gruppe eingeteilt. Innerhalb der AM-Gruppe gaben 19 Patientinnen eine Beschwerdesymptomatik an, während 23 beschwerdefrei waren. In der KG berichteten 8 Patientinnen von Schmerzen und 11 waren beschwerdefrei. Bei den Schmerzen handelte es sich weitestgehend um Dysmenorrhoe und Unterbauchschmerzen. Die Patientinnen ohne Schmerzsymptomatik litten an Hypermenorrhoe. Bezüglich der Intensität der angegebenen Schmerzen gab es keine weiteren Angaben. Alle Marker wurden einzeln untersucht und ausgewertet. Innerhalb der AM- sowie der Kontrollgruppe wurden die Patientinnen mit und ohne Schmerzen verglichen. Es zeigten sich in Bezug auf die Schmerzsymptomatik mit allen vier Markern keine Unterschiede in der Innervation (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19); $p > 0,05$; Mann Whitney Test).

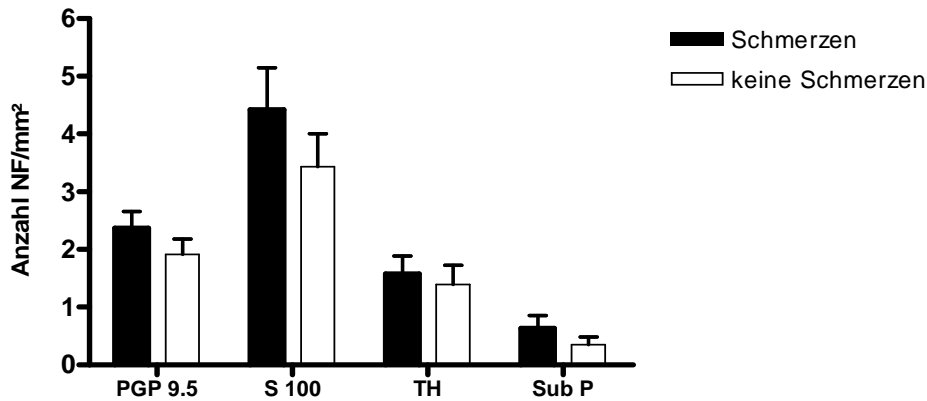


Abbildung 18: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM bezüglich der Schmerzen
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF im Myometrium. NF= Nervenfasern

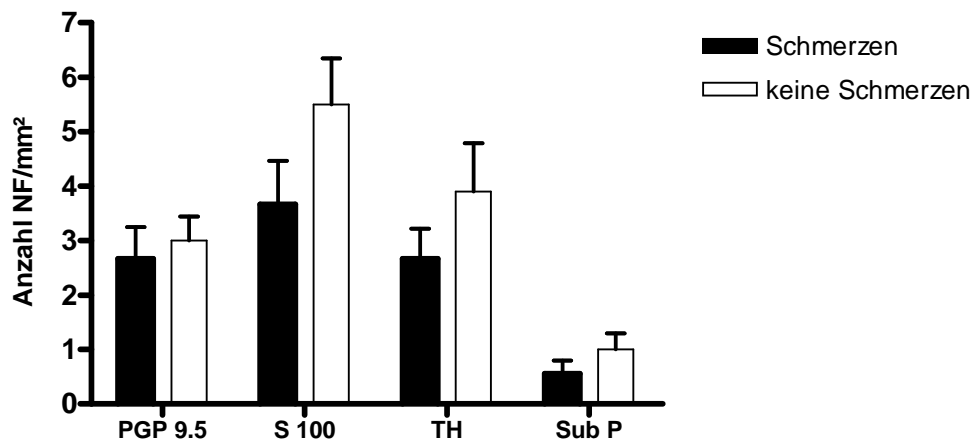


Abbildung 19: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen der KG bezüglich der Schmerzen
 Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF im Myometrium. NF= Nervenfasern

3.1.6 Gravidität

Der Einfluss einer Schwangerschaft auf die myometriale Innervation sollte untersucht werden. Dazu wurden die Patientinnen in Bezug auf die Gravidität unterteilt. Innerhalb der AM-Gruppe waren 35 Frauen mindestens einmal schwanger, während 7 Frauen nie schwanger waren. In der KG gaben 14 Frauen an, schon mindestens

einmal schwanger gewesen zu sein, während 5 Frauen nie schwanger waren. Alle Marker wurden einzeln untersucht und ausgewertet. Dabei wurden innerhalb beider Gruppen Multigravida mit Nullgravida verglichen. Die Anzahl PGP 9.5-, S 100-, TH- und Sub P-positiver NF ist innerhalb der KG bei den Frauen signifikant reduziert, die mindestens einmal schwanger waren (* $p < 0,05$; T-Test; siehe Abbildung 20). Innerhalb der AM-Gruppe gibt es keine Unterschiede in der Innervation ($p > 0,05$; T-Test; siehe Abbildung 21).

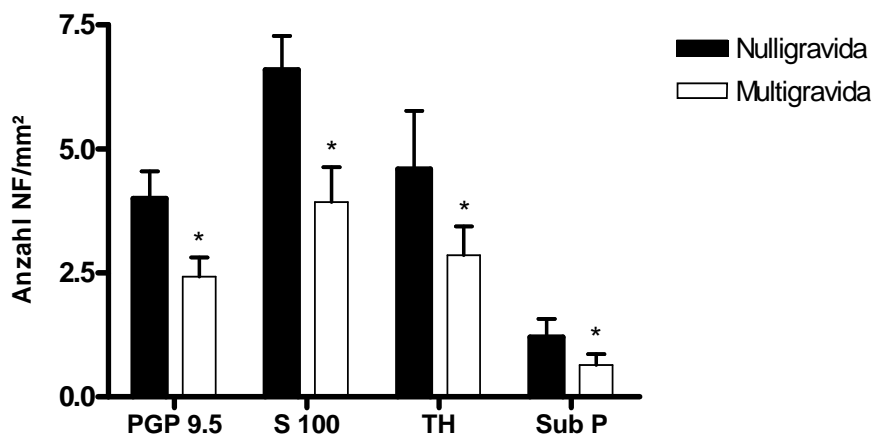


Abbildung 20: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen ohne AM bezüglich der Gravidität

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF im Myometrium von Patientinnen der KG. NF= Nervenfaser; * $p < 0,05$

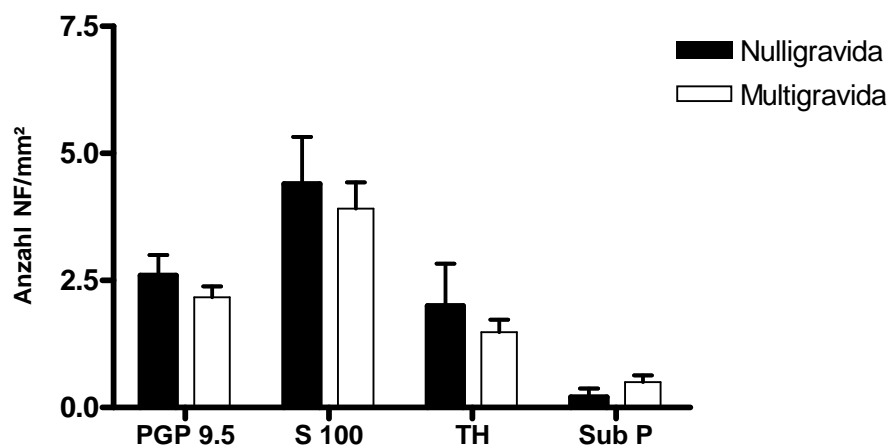


Abbildung 21: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM bezüglich der Gravidität

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF im Myometrium von Patientinnen der KG. NF= Nervenfaser; $p > 0,05$

3.1.7 Parität

Um zu untersuchen, ob die Parität einen Einfluss auf die Innervation des Uterus nimmt, wurde das Patientinnenkollektiv in Bezug auf die Parität gleichermaßen ausgewertet wie auf die Gravidität. Es gab innerhalb der AM-Gruppe 30 multipare Frauen, 12 Frauen waren Nullipara. Von den 19 Patientinnen der KG waren 10 Frauen Multipara und 9 Frauen waren Nullipara. Innerhalb der KG wurde die Anzahl PGP 9.5-, S 100-, TH- und Sub P-positiver NF von Nullipara- und Multiparapatientinnen verglichen und ausgewertet. Dabei konnte eine tendenziell reduzierte Anzahl PGP 9.5- und Sub P-positiven NF bei Frauen mit durchgemachter Geburt dargestellt werden (PGP 9.5: $p < 0,07$; T-Test; Sub P: $p = 0,06$; Mann Whitney Test; siehe Abbildung 22). Es konnten keine Unterschiede der Innervation S100- und TH-positiver NF dargestellt werden ($p > 0,05$; T-Test; siehe Abbildung 22. Mit der AM-Gruppe wurde ebenso verfahren. Hier konnten in Bezug auf alle untersuchten Marker keine Unterschiede der Innervation beobachtet werden ($p > 0,05$; T-Test; siehe Abbildung 23).

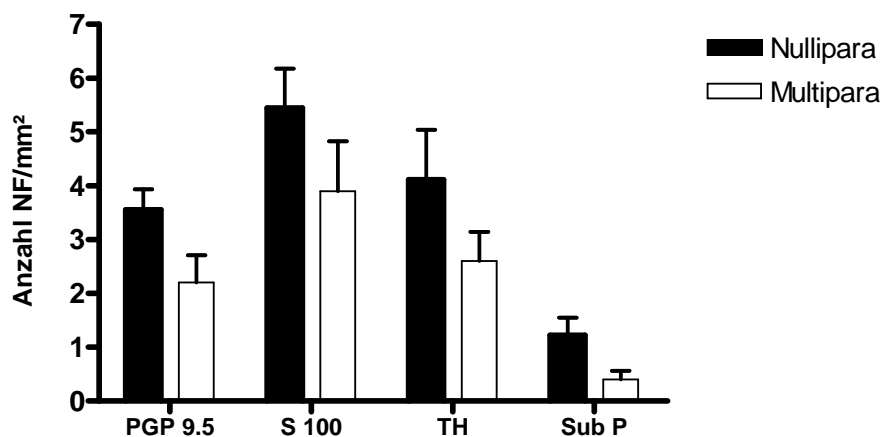


Abbildung 22: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen ohne AM bezüglich der Parität

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF im Myometrium von Patientinnen der KG. NF=Nervenfasern.

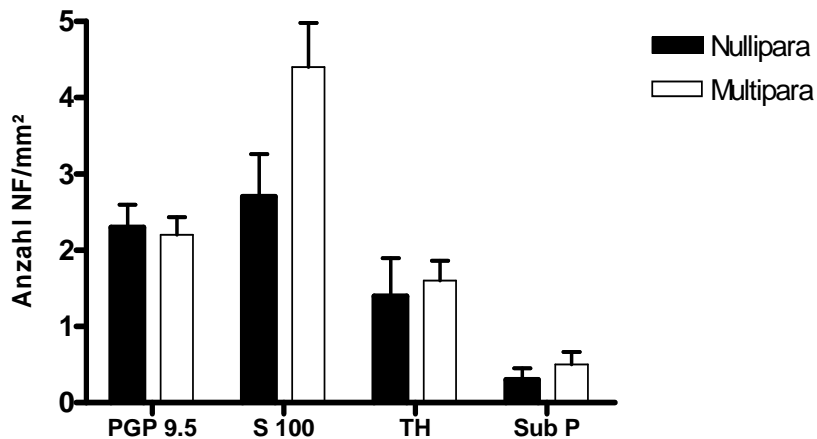


Abbildung 23: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM bezüglich der Parität

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF von Patientinnen der KG. NF=Nervenfaser; $p>0,05$

3.1.8 Koinzidenz von Endometriose

Bei insgesamt 8 Patientinnen aus der AM-Gruppe bestand eine Koinzidenz von *Endometriosis genitalis externa*. Um auszuschließen, dass die bisherigen Ergebnisse maßgeblich von EM beeinflusst sind, wurde die Nervenfaserdichte im Myometrium und Endometrium bei Patientinnen mit AM (und EM) im Vergleich zur Kontrollgruppe erneut statistisch ausgewertet. Die Patientinnen, die sowohl an AM als auch EM erkrankt waren, wurden dabei ausgeschlossen. Die Ergebnisse änderten sich nicht (siehe Abbildung 24).

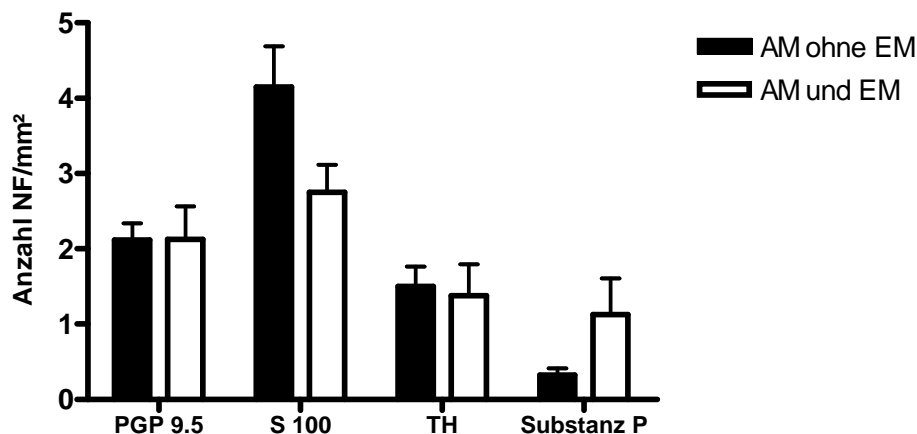


Abbildung 24: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM alleine und mit einer Koinzidenz von AM und EM

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der Anzahl der myelinisierten, intakten myelinisierten und unmyelinisierten, sympathischen und sensiblen NF. NF=Nervenfaser; $p>0,05$

3.2 Immunhistochemische Doppelfärbung gegen Tyrosinhydroxylase und Östrogenrezeptor α und β

Um den Einfluss von Östrogen auf die Neuroimmunmodulation in AM untersuchen zu können, sollte zunächst nachgewiesen werden, ob uterine NF ER exprimieren. Dazu wurde an jeweils 10 Präparaten eine immunhistochemische Doppelfärbung gegen TH und ER α bzw. ER β durchgeführt. In allen Präparaten waren sowohl NF als auch ERs nachweisbar. Die semiquantitative Analyse zeigte, dass sowohl ER α als auch ER β in TH-positiven sympathischen NF im Myometrium von Frauen sowohl mit als auch ohne AM exprimiert sind (siehe Abbildung 25). Innerhalb der KG exprimierten nur 54 % der sympathischen NF ER α während ER β in allen TH-positiven NF exprimiert war (siehe Abbildung 26). Im Myometrium von Patientinnen mit AM exprimierten 84 % der sympathischen Nervenfasern ER α während ER β in allen TH-positiven NF exprimiert war (siehe Abbildung 26). Die Expression von ER α ist im uterinen Gewebe von Patientinnen mit AM im Vergleich zur KG tendenziell höher ($p=0,07$; Mann Whitney Test). Das Verhältnis von ER α - zu ER β -positiven sympathischen NF ist bei AM im Vergleich zur KG zugunsten von ER α verschoben (AM: ER α / ER β = 0.5; KG: ER α / ER β = 0.85; $p< 0.05$; siehe Abbildung 26). Es gab bezüglich der Expression von ERs keine Unterschiede in der Nähe von AM-Läsionen.

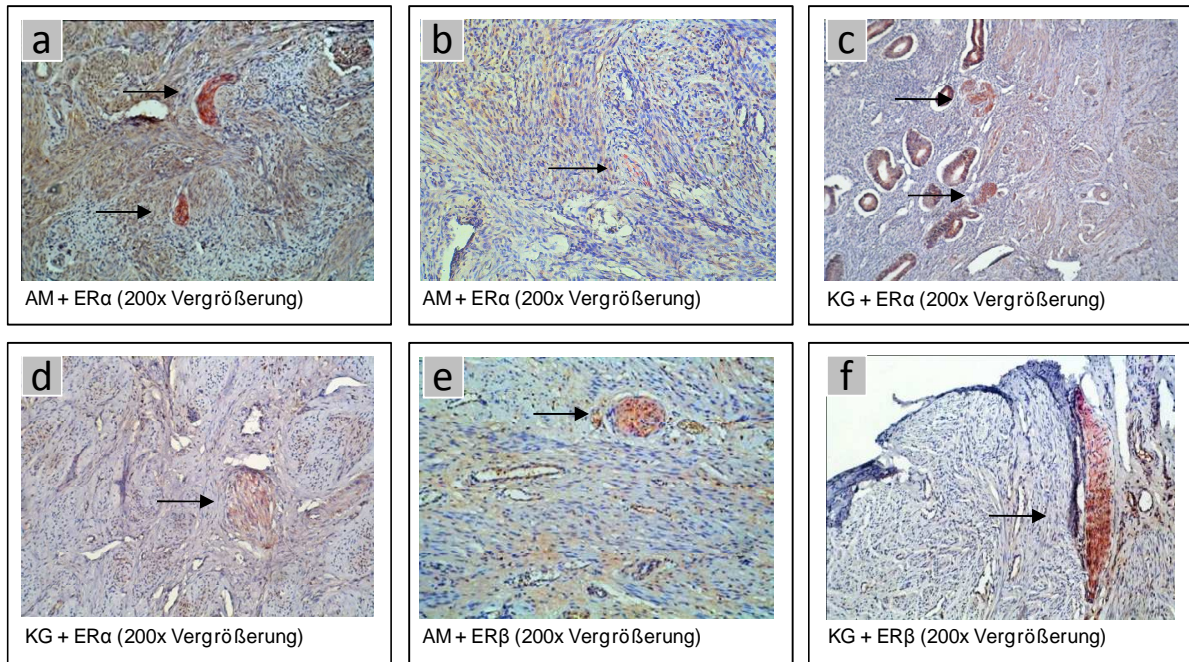


Abbildung 25: immunhistochemische Darstellung der Kolokalisation von ER α und ER β in sympathischen TH-positiven NF von Frauen mit und ohne AM

Die Präparate von Patientinnen mit AM wiesen Unterschiede bezüglich der Expression von ER α in sympathischen NF auf. Es gab sowohl NF, in denen ER α nachgewiesen werden konnte (a) als auch NF, in denen kein ER α nachgewiesen werden konnte (b). Auch innerhalb der KG gab es NF mit ER α -Expression (c) als auch ohne (d). ER β konnte hingegen in allen Präparaten von AM (e) und KG (f) in sympathischen NF nachgewiesen werden. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe

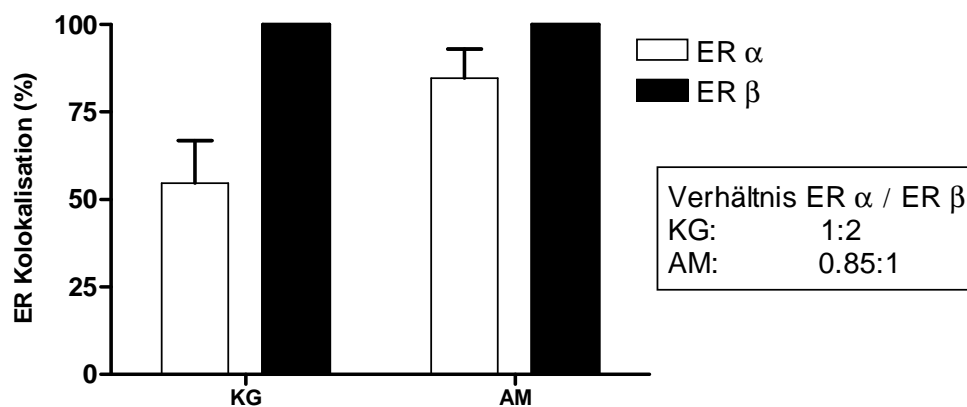


Abbildung 26: Darstellung der Kolokalisation von ER α und ER β in % in sympathischen TH-positiven NF von Frauen mit und ohne AM

In AM und KG kolokalisieren ER β mit sympathischen NF zu 100%. In der KG kolokalisieren ER α zu 50% mit sympathischen NF, während bei AM in 85% der NF eine Kolokalisation besteht. NF= Nervenfasern; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe

3.3 Neurotrophe Eigenschaften der AM

Um zu untersuchen, ob AM ebenso wie die peritoneale EM zu einer veränderten PF mit neurotrophen Eigenschaften führt, wurde die PF von Patientinnen mit ausschließlicher AM in einem neuronalen *in-Vitro*-Wachstumsassay eingesetzt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Patientinnen mit Uterus myomatosus) ($p > 0,05$, Mann Whitney Test; siehe Abbildung 27). Die Inkubation der Ganglien mit NGF (Positivkontrolle) bewirkte eine Aussprossung von Grad 3, wohingegen alleiniges Medium (Negativkontrolle) gar keine Aussprossung von Nervenfasern induzierte (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Eine fotografische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 27 zu sehen. Die PF von Patientinnen mit AM ist unverändert und zeigt keine neurotrophen Eigenschaften.

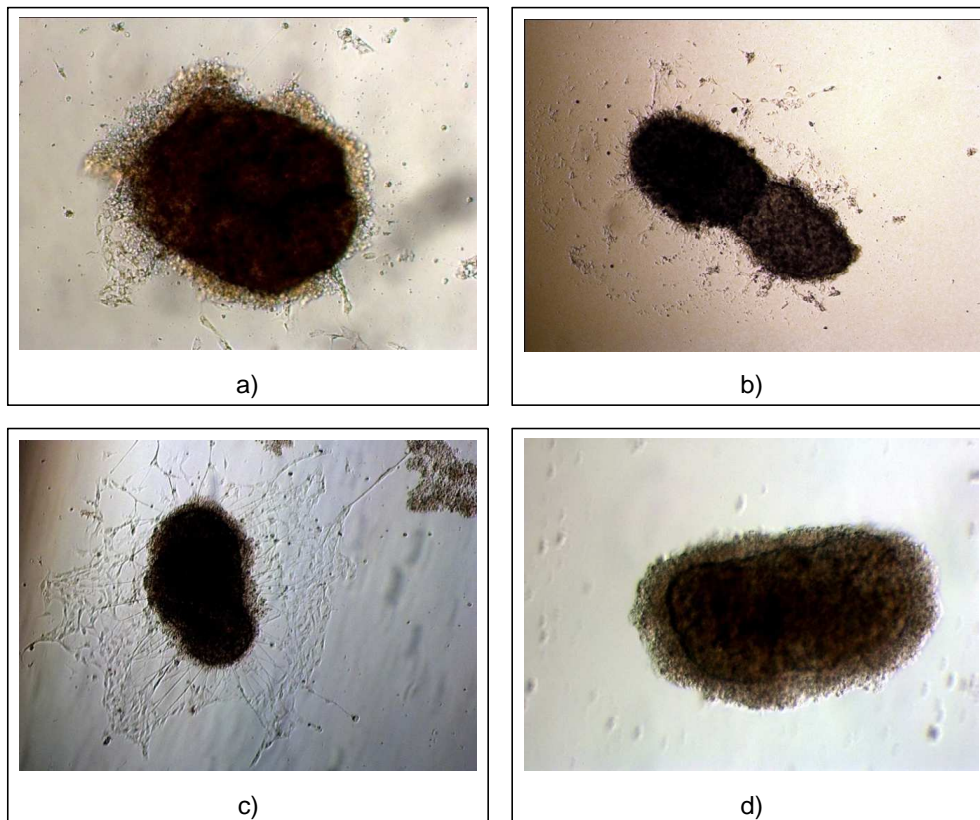


Abbildung 27: Neuritenausprossung aus sympathischen paravertebralen Ganglien

a) Ganglion kultiviert in PF einer AM-Patientin; 10-fache Vergrößerung b) Ganglion kultiviert in PF einer Patientin aus der KG; 5-fache Vergrößerung c) Positivkontrolle (Ganglion in DMEM mit 0,1 ng/ml *Nerve Growth Factor-2,5S*); 5-fache Vergrößerung d) Negativkontrolle (Ganglion nur in DMEM kultiviert); 10-fache Vergrößerung

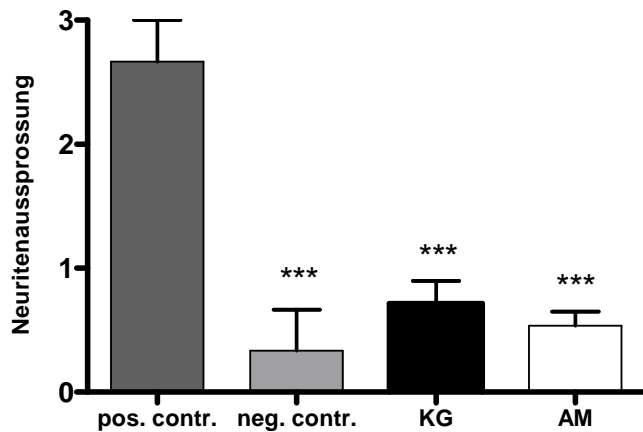


Abbildung 28: Dargestellt ist die Neuritenausprossung auf einer Skala von 0 bis 3 aus sympathischen paravertebralen Ganglien inkubiert in Positiv- und Negativkontrolle sowie in PF von Frauen mit und ohne AM
 pos.contr.= Positivkontrolle; neg.contr.= Negativkontrolle; KG= Kontrollgruppe; AM= Adenomyosegruppe; *** p<0,001

3.3.1 GAP 43- und TH-Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paravertebralen Ganglien

Alle Ganglien, die in PF sowohl von Frauen mit als auch ohne AM inkubiert wurden, zeigten eine positive GAP 43-Ausprossung (siehe Abbildung 29). Des Weiteren wurden alle Ganglien gegen TH gefärbt, um zu belegen, dass es sich bei den präparierten Ganglien tatsächlich um sympathische Ganglien handelt. Auch hier zeigten alle Ganglien eine positive TH-Anfärbung (siehe Abbildung 29).

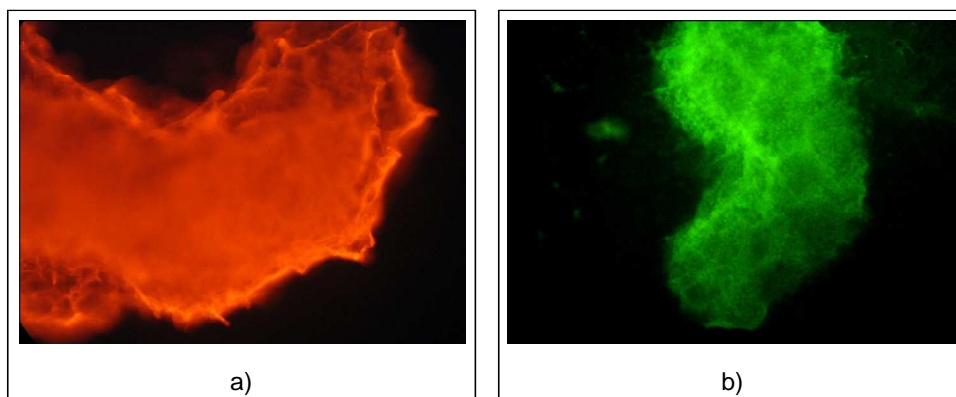


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paravertebralen Ganglien

a) Ganglion kultiviert in PF einer Kontroll-Patientin; angefärbt gegen GAP 43; 100-fache Vergrößerung b) Ganglion kultiviert in PF einer Patientin mit AM; angefärbt gegen TH; 100-fache Vergrößerung

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird detailliert die Gesamtnervenfaserdichte mit Charakterisierung von sensiblen und sympathischen NF in allen anatomischen Schichten im gesunden Uterus und in Uteri mit AM beschrieben und miteinander verglichen. Weiterhin wird die Nervenfaserdichte in Korrelation zu klinischen Parametern, wie Schmerzen, Zyklusphasen, Hormonstatus, Gravidität und Parität, beurteilt. In früheren Untersuchungen wurden keine systematischen Analysen der uterinen Innervation aller anatomischen Schichten und entsprechender Charakterisierung der verschiedenen Nervenfasertypen vorgenommen. Auch ein systematischer Vergleich von Patientinnen mit AM und ohne AM und EM fehlte bislang. Deshalb ergänzt diese Arbeit die bisherigen Untersuchungen zur uterinen Innervation durch eine qualitative und quantitative Analyse der unterschiedlichen Nervenfasertypen. Des Weiteren wurde der Einfluss von ER α und ER β auf die sympathische Innervation anhand von immunhistochemischen Doppelfärbungen untersucht.

Ein wesentliches Ergebnis ist, dass bei Patientinnen mit AM ein zyklusunabhängiger Rückgang sympathischer NF im Myometrium vorliegt und dass dieses Phänomen möglicherweise durch eine lokale Östrogenüberexpression sowie durch ein Missverhältnis von neuronalen ER α und ER β bedingt ist. Außerdem konnte in dieser Studie belegt werden, dass die PF von Frauen mit AM keine neurotrophen Eigenschaften aufweist.

4.1 Innervation des Myometriums

Das Myometrium von Frauen mit AM weist im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte uterine Innervation auf. Auch in anderen klinischen retrospektiven Studien wurde bereits eine Veränderung der NF-Dichte bei Patientinnen mit AM belegt (Quinn and Kirk 2002; Quinn 2007). Diesbezüglich hat die Arbeitsgruppe um Quinn immunhistochemische Versuche an hysterektomierten Uteri durchgeführt und konnte zeigen, dass in der endometrialen-myometrialen Junktionalzone sowie im

Myometrium bei AM-Patientinnen weniger NF vorhanden waren als in den gleichen uterinen Schichten der Kontrollgruppe (Quinn and Kirk 2002; Quinn 2007). In diesen Studien fehlt jedoch eine weitere Charakterisierung der NF. Es wurden die Panmarker PGP 9.5 und S100 für die immunhistochemischen Färbungen verwendet, die alle intakten myelinisierten und unmyelinisierten (PGP 9.5) bzw. myelinisierten (S100) NF anfärben ohne die entsprechenden Qualitäten zu differenzieren (Quinn and Kirk 2002; Quinn 2007).

Die in dieser Studie durchgeführte Charakterisierung der unterschiedlichen Nervenfasertypen belegt, dass es vor allem die sympathischen NF sind, die bei Patientinnen mit AM signifikant vermindert sind. Mit dem Panmarker PGP 9.5 als Marker für intakte myelinisierte und unmyelinisierte NF (Zoubina and Smith 2001) konnten weniger NF nachgewiesen werden als mit dem Panmarker S100. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass sympathische NF degenerieren und damit nicht mehr als intakte NF nachweisbar sind. Es ist bekannt, dass die sympathische Innervation des gesunden Myometriums zyklischen Schwankungen unterliegt. Es findet sich eine Hochregulation der sympathischen Innervation während der proliferativen Phase und eine Reduktion während der sekretorischen Phase. Dieses Phänomen konnte bereits anhand von tierexperimentellen Untersuchungen belegt werden, in denen ein Rückgang sympathischer NF während der Trächtigkeit oder in östrogenreichen Phasen des Zyklus beobachtet wurde (Zoubina et al. 1998; Zoubina and Smith 2000; Krizsan-Agbas et al. 2003). Dabei zeigt sich, dass auf eine östrogenreiche Phase des Zyklus ein Rückgang der sympathischen NF folgt (Latini et al. 2008). Auch andere tierexperimentelle Studien belegen bereits, dass die uterine Innervation hormonellen Schwankungen unterlegen ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass sympathische NF während der Schwangerschaft degenerieren und nach der Entbindung wieder regenerieren (Sporrong et al. 1981; Yamada 1988; Haase et al. 1997). Möglicherweise könnte ein Rückgang der NF während der Schwangerschaft den sich entwickelnden Fötus bis zur Entbindung schützen, indem unwillkürliche Kontraktionen gemindert werden (Latini et al. 2008), die von sympathischen NF ausgelöst werden (Fanghänel et al. 2003). Zyklusabhängige Kontraktionen sind im unbefruchteten Uterus bekannt und möglicherweise als Voraussetzung für einen gerichteten Spermientransport maßgeblich in der frühen Phase der Reproduktion (Leyendecker et al. 2004). Veränderungen der uterinen

Innervation konnten auch im natürlichen Zyklus beobachtet werden (Zoubina et al. 1998; Zoubina and Smith 2001). Eine Degeneration der terminalen sympathischen Axone konnte mit einem Anstieg von Östrogen assoziiert werden, während eine Regeneration in Phasen niedriger Östrogenkonzentrationen zu beobachten war (Krizsan-Agbas et al. 2003). Dazu wurden bereits Untersuchungen an ovariectomierten Mäusen durchgeführt, die belegen, dass eine Ovariectomie und eine damit einhergehende Reduktion der Östrogenkonzentration zu vermehrter sympathischer Nervenfaserausdrückung führt und dass diese durch subkutane Östrogenzufuhr wieder reduziert werden kann (Zoubina and Smith 2001). Die Wirkung von Östrogen beruht dabei auf der Bindung des Östrogens an intrazelluläre Östrogenrezeptoren (ER α und ER β), die auf diesem Wege die Genexpression innerhalb der Zelle regulieren (Pelletier and El-Alfy 2000). Der inhibitorische Effekt von Östrogen scheint dabei vor allem mit einer Bindung an den Östrogenrezeptor α (ER α) gekoppelt zu sein. Diese Tatsache belegen Zoubina und Smith 2001 in ihrer Studie, in der ER α Knock-Out Mäuse mit Mäusen vom Wild-Typ verglichen wurden. Die Uteri der ER α -Knock-Out Mäuse waren im Vergleich zu den Uteri der Kontrollgruppe um das 2-3fache innerviert. Den ovariectomierten Mäusen vom Wild-Typ wurde anschließend subkutan Östrogen verabreicht, welches zu einer signifikanten Verminderung der uterinen Innervation führte. Bei den Knock-Out-Mäusen führte jedoch weder eine Ovariectomie noch eine subkutane Östrogensupplementation zu einer Veränderung der Innervation (Zoubina and Smith 2001).

Interessanterweise konnten derartige Innervationsschwankungen im Myometrium der Patientinnen mit AM an dieser Stelle nicht beobachtet werden, hier sind die sympathischen NF in allen Phasen des Zyklus gleichermaßen vermindert exprimiert. Dies ist ein wichtiger Hinweis, dass das natürliche hormonabhängige *Remodelling* in Uteri von Frauen mit AM möglicherweise gestört ist. In der Literatur gibt es Beschreibungen des archimetralen Hyperestrogenismus bei Frauen mit EM und AM (Leyendecker and Kunz 2005). Dabei konnte bei Frauen mit EM eine erhöhte Östrogenkonzentration im menstruellen Blut im Vergleich zu Patientinnen ohne EM festgestellt werden, während die Östrogenkonzentrationen im peripheren Blutkreislauf ähnlich waren (Takahashi et al. 1989). Die hohen Östrogenkonzentrationen lassen sich dabei durch eine Hochregulierung des Enzyms

P450 Aromatase erklären. Dieses Enzym ist maßgeblich an der Synthese von Östrogen aus Testosteron beteiligt (Garcia-Segura 2008). In immunhistochemischen Untersuchungen in unserer eigenen Forschergruppe konnte bereits eine erhöhte Expression der P450 Aromatase im Myometrium von Uteri von Frauen mit AM im Vergleich zur KG bestätigt werden (Julia Arnold, nicht veröffentlichte Daten). Das Phänomen der lokalen Aromatase-Überexpression wird ebenfalls bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA), beobachtet (Capellino and Straub 2008) und scheint mit einer Erhöhung der lokalen Östrogenkonzentration und einer damit im Zusammenhang stehenden Degenerierung sympathischer NF einherzugehen.

Die Tatsache, dass Östrogene ein De- und Regenerieren sympathischer NF im gesunden Uterus modulieren, lässt die Vermutung aufstellen, dass die Einnahme von Hormonen ebenfalls die uterine Innervation beeinflussen könnte. Bei Frauen mit AM konnten keine Unterschiede in der Innervation bezüglich einer Hormonmedikation festgestellt werden. Innerhalb der KG zeigte sich jedoch eine tendenziell verminderte NF-Aussprossung sympathischer NF bei Patientinnen, die unter Hormonmedikation (orale Kontrazeptiva) standen. Die Ergebnisse stellen sich vermutlich deshalb als Tendenz dar, weil nur eine geringe Fallzahl von drei Patientinnen aus der KG hormonell therapiert wurde. Daher sollte die Interpretation dieses Ergebnisses kritisch bewertet werden. Man könnte allerdings vermuten, dass die Gabe von Hormonen die uterine Innervation des gesunden Uterus beeinflusst. Untersuchungen zur NF-Dichte im Zusammenhang mit Hormonen wurden bislang nur bei Patientinnen mit EM durchgeführt (Tokushige et al. 2008). Dort konnte nachgewiesen werden, dass im Endometrium und Myometrium hormonbehandelter Patientinnen deutlich weniger NF vorhanden waren als bei nicht hormonbehandelten Frauen. Es sind demnach dringend Folgeuntersuchungen notwendig, um genauer zu eruieren, in welchem pathophysiologischen Zusammenhang die Einnahme von Hormonen auf die Innervation des Uterus stehen könnte.

Nicht nur in Tiermodellen, sondern auch in humanem uterinen Gewebe konnte ein vermindertes Vorkommen von NF im Myometrium von schwangeren Frauen beobachtet werden (Wikland et al. 1984), so dass die Vermutung naheliegt, dass auch der menschliche Uterus bedingt durch hormonelle Schwankungen

Veränderungen in der Innervation unterliegt. In dieser Untersuchung war die Anzahl sympathischer NF im gesunden Uterus nach einer Schwangerschaft bzw. einer Geburt vermindert, während bei Frauen mit AM keine Unterschiede feststellbar waren. Diese Beobachtungen decken sich mit Beobachtungen aus anderen Arbeitsgruppen. In Bezug auf AM kann an dieser Stelle erneut geschlussfolgert werden, dass das natürliche *Remodelling* des gesunden Uterus, welches durch hormonelle Schwankungen induziert wird, bei Frauen mit AM gestört ist.

Interessanterweise setzt sich das an AM erkrankte Patientinnenkollektiv von insgesamt 42 Patientinnen aus 30 multiparen und 12 nulliparen Patientinnen zusammen. Demzufolge sind 71% der Patientinnen aus der AM-Gruppe multipara, während aus der Kontrollgruppe nur 53% der Patientinnen multipara sind. Diese Beobachtung unterstützt die Theorie von unterschiedlichen Autoren, dass es sich bei AM um eine Erkrankung handelt, die vor allem multipare Frauen betrifft (Mathur et al. 1962; Azziz 1989; Ferenczy 1998; Devlieger et al. 2003; Bergeron et al. 2006; Kitawaki 2006). Allerdings sei an dieser Stelle erneut darauf hingewiesen, dass die infertile Frau nur selten eine Hysterektomie in Betracht zieht und es deshalb deutlich mehr infertile Patientinnen mit AM gibt, als in der Literatur dazu bekannt ist. Neue Daten zeigen, dass bei IVF das Vorliegen einer AM als wichtigster Prognosefaktor für den Erfolg einer IVF anzusehen ist (Ballester et al. 2012) und belegen damit einen wichtigen Einfluss der AM auf die Schwangerschaftsrate. Zur Zeit wird das Thema Infertilität im Zusammenhang mit AM noch kontrovers diskutiert und sollte daher in anschließenden möglichst prospektiven Studien weiter untersucht werden..

In Bezug auf die Schmerzsymptomatik ist ebenfalls noch unklar, ob das Vorhandensein von NF im Myometrium von Patienten mit AM mit einer positiven Schmerzanamnese korreliert (Zhang et al. 2009) oder nicht (Barcena de Arellano et al. 2012). Die Anzahl myelinisierter, intakter myelinisierter und unmyelinisierter, sensibler und sympathischer NF ist in dieser Studie in Bezug auf die Schmerzanamnese unverändert. Sowohl AM-Patientinnen als auch Patientinnen aus der KG, die eine positive Beschwerdesymptomatik aufweisen, zeigten eine ähnliche uterine Innervation wie Patientinnen ohne Schmerzen. Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen klinischen Studien nachgewiesen werden, in der hysterektomierte Uteri

von Patientinnen mit oder ohne AM und/oder EM mit positiver Schmerzanamnese auf das Vorhandensein von NF untersucht worden sind (Atwal et al. 2005; Barcena de Arellano et al. 2012), so dass es nicht wahrscheinlich scheint, dass die uterine Innervation direkt im Zusammenhang mit der Schmerzpathogenese von AM-Patientinnen steht.

4.2 Der Einfluss von Östrogen- und Adrenorezeptoren

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist der Nachweis, dass sympathische NF Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) exprimieren und dass eine hohe Östrogenkonzentration die Degenerierung der sympathischen NF möglicherweise über die Östrogenrezeptoren modulieren könnte. Das Verhältnis von ER α zu ER β war innerhalb der AM-Gruppe nahezu ausgeglichen (Verhältnis ER α / ER β : 0,85:1), während innerhalb der Kontrollgruppe die Östrogenrezeptoren in einem anderen Verhältnis zugunsten von ER β verteilt waren (Verhältnis ER α / ER β : 1:2). Diese Unterschiede in der Verteilung der beiden Östrogenrezeptoren könnten möglicherweise den Rückgang der sympathischen NF im Myometrium bei Frauen mit AM beeinflussen. Das östrogenabhängige *Remodelling* uteriner sympathischer NF wird vor allem durch den Östrogenrezeptor α (ER α) reguliert (Zoubina and Smith 2001). Untersuchungen an gesunden Ratten konnten belegen, dass das Verhältnis von ER α zu ER β in sympathischen Ganglien ähnlich war wie bei den Patientinnen der KG in dieser Studie (Zoubina and Smith 2002). Da in der hier vorliegenden Studie die Patientinnen mit AM deutlich mehr ER α in TH-positiven sympathischen NF exprimieren als die Kontrollpatientinnen, könnte das Verhältnis der Östrogenrezeptoren zueinander möglicherweise eine Rolle im Pathomechanismus der AM spielen.

Eine weitere wichtige Bedeutung könnten unter anderem auch die adrenergen Rezeptoren haben. Der wichtigste Neurotransmitter in den postganglionären Axonen von sympathischen NF ist dabei das Noradrenalin (NA), das nach seiner Freisetzung auf adrenerge Rezeptoren wirkt. Bei diesen unterscheidet man α - und β - Rezeptoren, die jeweils in verschiedene Subtypen unterteilt werden können (Koopman et al.

2011). In welcher Weise NA auf die Rezeptoren wirkt, hängt dabei vor allem von der Konzentration des NA ab. In hohen Konzentrationen werden sowohl α - als auch β -Adrenorezeptoren stimuliert, während in niedrigen Konzentrationen hauptsächlich die α -Adrenorezeptoren angeregt werden (Miller et al. 2000), siehe Abbildung 30). Des Weiteren ist bekannt, dass durch Östrogenzufuhr nach Ovariectomie α 2-Adrenorezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen aktiviert werden und infolgedessen die Vasokonstriktion verstärkt wird (Ferrer and Osol 1998). Außerdem kann eine Östrogenzufuhr die Dichte der α 2-Adrenorezeptoren in myometrialen glatten Muskelzellen erhöhen (Riemer et al. 1987; Vass-Lopez et al. 1990), während es gleichzeitig die Aktivität von β -Adrenorezeptoren inhibiert (Riemer et al. 1988; Petitti and Etgen 1990). Interessanterweise steigt die Dichte myometrialer β -Adrenorezeptoren auch nach einer Ovariectomie an (Nimmo et al. 1989). Diese Modulation könnte demnach ebenfalls durch Östrogenrezeptoren reguliert sein.

Wegen dieser Verschiebung von β - nach α -Adrenorezeptoren (auch *the β -to- α adrenergic shift* genannt; (Straub and Harle 2005) ist das Noradrenalin nicht imstande, über den β -Adrenorezeptor seine normalerweise hemmende Wirkung auf Immunzellen zu entfalten. Im Gegenteil würde NA nun über die Stimulation von α -Adrenorezeptoren proinflammatorische Effekte erzeugen. Gleichzeitig kann ein Verlust der sympathischen NF beobachtet werden. Der funktionelle Verlust von NF führt zur Entkoppelung der Wirkung von Noradrenalin, wodurch die Verschiebung von β - nach α -Adrenorezeptoren verstärkt wird (Straub and Harle 2005).

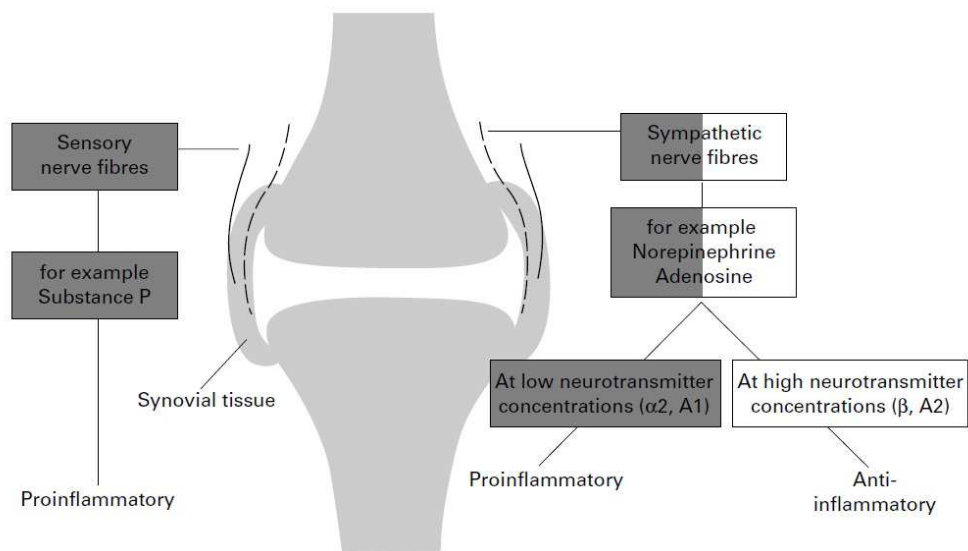


Abbildung 30: Einfluss sensibler und sympathischer NF bei Entzündung

Das Diagramm zeigt das Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Mechanismen. Substanz P und in geringen Konzentrationen Noradrenalin (Norepinephrin) wirken proinflammatorisch, während Noradrenalin in hohen Konzentrationen antiinflammatorisch wirkt (am Beispiel der Rheumatoiden Arthritis, aus Cutolo and Straub 2000).

Möglicherweise sind an dem Rückzug der sympathischen NF auch so genannte nervenrepulsive Faktoren (*nerve repellent factors*) beteiligt. Eine Substanzklasse solcher repulsiven Faktoren stellt die Familie der Semaphorine dar (Goshima et al. 2000). Diese Proteine sind transmembranale und sezernierte nervenrepulsive Faktoren, die extrazellulär durch einen spezifischen abstoßenden Einfluss entweder an sympathischen oder an primären afferenten sensiblen Fasern mittels verschiedener Oberflächerezeptoren (Neuropilin-1 und Neuropilin-2) wirksam werden (Kolodkin and Ginty 1997). Dabei ist es vor allem das Semaphorin 3F (Sema3F), das einen abstoßenden Effekt an sympathischen NF ausübt (Chen et al. 1998; Fassold et al. 2009; Ieda and Fukuda 2009; Fassold and Straub 2010). In einer tierexperimentellen Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass die Zufuhr von Östrogen zu einer signifikanten Hochregulierung von Sema3F führt (Richeri et al. 2011). Eine Überexpression von Sema3F kann demnach zu vermehrter sympathischer Degeneration führen und folglich ein Bestandteil des *Remodellings* uteriner NF unter hormonellen Schwankungen sein. Die Rolle von nervenrepulsiven Faktoren mit entsprechender Modulation des Nervensystems mit Nervenverlust ist bei AM noch nicht vollständig untersucht worden. Erste immunhistochemische Untersuchungen zeigen jedoch die Expression von Sema3F in uterinem Gewebe von

Frauen mit AM. Dabei wird Sema3F in Uteri von Frauen mit AM signifikant vermehrt exprimiert als in der Kontrollgruppe (Claudia Arellano Estrada, nicht veröffentlichte Daten). Die Rolle der Semaphorine und der Neuropiline sowie deren Bedeutung in der Pathogenese von AM sollte daher in Folgestudien dringend evaluiert werden.

Die Tatsache, dass durch eine erhöhte Östrogenkonzentration und die möglicherweise resultierende Hochregulation von Sema3F eine Degeneration sympathischer NF mit anschließender geringerer Ausschüttung des Neurotransmitters Noradrenalin zu einem Ungleichgewicht myometrialer α - und β -Adrenorezeptoren führt, könnte möglicherweise das entzündliche Krankheitsbild der AM erklären.

Um die vorliegenden Ergebnisse zu unterstützen, sollten in Folgestudien die sensiblen bzw. sympathischen Marker sowie die Östrogenrezeptoren auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Außerdem sollte es in Zukunft ein vorrangiges Ziel sein, die genaueren Pathomechanismen zu untersuchen, die im Krankheitsbild der AM zu einem Rückzug sympathischer NF führen. Die Rolle der verschiedenen Semaphorine und deren Rezeptoren könnten in diesem Zusammenhang möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen und sollten daher genauer untersucht werden. Ebenso muss in Folgestudien eruiert werden, ob bei Frauen mit AM ein Ungleichgewicht myometrialer α - und β -Adrenorezeptoren besteht.

4.3 Innervation des Endometriums und der endometrialen-myometrialen Junktionalzone

In Bezug auf die aktuell international geführte Diskussion, ob das Endometrium von Patientinnen mit peritonealer Endometriose innerviert ist oder nicht, sind die dargestellten Daten von besonderer Bedeutung. Hier konnten in full-thickness-Präparaten sowohl die Junktionalis, die Basalis als auch die Funktionalis systematisch auf das Vorkommen von NF untersucht werden und die Resultate führten zu dem Ergebnis, dass das Endometrium (Basalis und Funktionalis) und die endometriale-myometriale Junktionalzone bei Frauen sowohl mit als auch ohne AM und EM kaum innerviert sind. Im Stratum basale konnten nur in vereinzelt

Präparaten NF dargestellt werden, während im Stratum functionale gar keine NF nachgewiesen werden konnten.

In ähnlichen Untersuchungen von Zhang konnten hingegen intakte PGP 9.5-positive NF im Stratum functionale von Frauen mit AM alleine, EM alleine, uterinen Myomen und einer Koinzidenz von AM und EM nachgewiesen werden (Zhang et al. 2009). Die NF waren jedoch nur bei Frauen mit positiver Schmerzanamnese nachweisbar, was zu der Annahme führte, dass ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von intakten Nerven im Stratum functionale des Uterus und der Schmerzpathogenese der oben benannten Krankheiten besteht (Zhang et al. 2009). In einer anschließenden Studie wurden Endometrium und Myometrium von Frauen mit AM oder uterinen Myomen in Bezug auf die Nervenfaserdichte und Schmerzsymptomatik analysiert (Zhang et al. 2009a). Dabei konnten intakte PGP 9.5-positive NF in 69% der Frauen mit positiver Schmerzanamnese im Stratum functionale dargestellt werden, wohingegen im uterinen Gewebe von Frauen ohne Beschwerdesymptomatik keine NF vorhanden waren (Zhang et al. 2009). In beiden Studien konnten innerhalb der Patientengruppe mit Schmerzen keine Unterschiede bezüglich der Nervenfaserdichte festgestellt werden, unabhängig davon, ob es sich um AM alleine, EM alleine, uterine Myome oder um eine Koinzidenz von AM und EM handelte. Außerdem wurde der Schweregrad der Schmerzsymptomatik nicht weiter berücksichtigt. Sehr kritisch zu bewerten ist allerdings, dass es sich bei der ausgewerteten Nervenfaserdichte von $\leq 0,8$ NF/mm² um sehr überinterpretierte Daten handelt. Außerdem wurden lediglich die Panmarker PGP 9.5 und Neurofilament zur Charakterisierung intakter myelinisierter und unmyelinisierter bzw. myelinisierter NF verwendet. Da PGP 9.5 neben intakten NF jedoch auch neuroendokrine Zellen sowie Endothelzellen in Gefäßen anfärbt (Dhillon et al. 1985; Leiblich et al. 2007; Barcena de Arellano et al. 2010a), könnten positive Signale möglicherweise auch fehlinterpretiert worden sein.

Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt ebenfalls das Vorkommen von kleinen NF im Stratum functionale von Patientinnen mit EM, wohingegen bei Frauen ohne EM keine NF im Stratum functionale nachweisbar waren (Tokushige et al. 2006). Diese Untersuchungen führten zu der Hypothese, dass das Vorkommen von NF im Stratum functionale möglicherweise die Grundlage für einen diagnostischen Test bilden könnte. Auf dieser Grundlage anlehnend führte die Arbeitsgruppe eine prospektive

Studie an einer kleinen Patientengruppe (Patientinnen mit EM: n = 20; Patientinnen ohne EM: n = 17) durch (Al-Jefout et al. 2007). In einem minimalinvasiven chirurgischen Eingriff wurde eine Endometriumsbiopsie entnommen und das gewonnene Gewebe mit dem Panmarker PGP 9.5 auf das Vorhandensein von intakten NF untersucht. In allen Gewebeschnitten von EM-Patientinnen konnten NF im Stratum basale und im Stratum functionale nachgewiesen werden, wohingegen in keinem einzigen Präparat der Kontrollgruppe NF im Endometrium nachweisbar waren (Al-Jefout et al. 2007). Die Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Präparate erfolgte durch das Computerprogramm *Image Pro Plus Discovery*. Hier kann ebenfalls kritisch bemerkt werden, dass mit dieser Methode möglicherweise unspezifische Reaktionen oder neuroendokrine Zellen fälschlicherweise als NF bewertet wurden. Dadurch würde sich auch die überdurchschnittlich hohe Anzahl an NF erklären ($27/\text{mm}^2 \pm 56/\text{mm}^2$), die hier ermittelt wurde. In einer Folgestudie mit höherer Fallzahl (Patientinnen mit EM: n=64; Patientinnen ohne EM: n=35) konnte im Stratum functionale von EM-Patientinnen lediglich eine Nervenfaserdichte von $2,7/\text{mm}^2 \pm 3,5$ beobachtet werden (Al-Jefout et al. 2009). Bei einer Patientin mit EM waren nun keine NF im Stratum functionale nachweisbar und bei sechs Frauen hingegen ohne EM konnten doch NF im Stratum functionale dargestellt werden (Al-Jefout et al. 2009). Die Ergebnisse dieser beiden Studien weichen massiv voneinander ab. In der zweiten Studie wurde die Auswertung von zwei immunhistochemisch erfahrenen Personen durchgeführt, was möglicherweise die realistischere Anzahl der NF erklärt.

In einer anderen Studie aus unserer Arbeitsgruppe decken sich die Ergebnisse weitestgehend mit denen von Quinn und belegen, dass das Endometrium von Frauen mit AM alleine und mit AM und EM kaum innerviert ist ($0,5 \pm 0,7$ NF/mm², gegen S 100 angefärbt). Lediglich in der endometrialen-myometrialen Junktionalzone von Patientinnen ohne AM und EM ließen sich einige positive Signale darstellen ($1,4 \pm 1,9$ NF/mm²) (Barcena de Arellano et al. 2012).

Auch in tierexperimentellen Arbeiten mit Ratten konnten ähnliche Ergebnisse im Sinne einer geringeren Innervation des Endometriums im Gegensatz zum Myometrium beobachtet werden (Haase et al. 1997). Insgesamt ist jedoch zurzeit die Datenlage über das Vorhandensein von NF im Stratum functionale von Patientinnen

mit AM und EM und deren Bedeutung unklar und wird kontrovers beschrieben. Daher sollte in weiteren Studien näher auf dieses Thema eingegangen werden.

4.4 Innervation der Läsionen

Neben Myometrium und Endometrium wurden auch die AM-Läsionen auf das Vorkommen von NF untersucht. In früheren Untersuchungen ließen sich mit dem Panmarker PGP 9.5 keine intakten myelinisierten und unmyelinisierten NF nachweisen (Quinn 2007). Lediglich am Rande der Läsion waren in einigen Präparaten wenige intakte NF geringen Durchmessers nachweisbar (Quinn 2007). Die Ergebnisse decken sich mit denen aus dieser Untersuchung, in der gezeigt werden konnte, dass sowohl die Läsionen als auch die unmittelbare Umgebung nicht innerviert werden. Nur in wenigen Präparaten waren positive Signale am Rande der Läsion zu sehen. Möglicherweise deuten die kleinen NF am Rand der Läsionen auf eine Reinnervation hin. Dieses Phänomen ist bereits mehrfach an hysterektomierten Uteri belegt worden. Dabei wurde von einer sogenannten Reinnervation gesprochen, wenn es sich um NF geringen Durchmessers handelte. Diese wurden vor allem bei Patientinnen mit positiver Schmerzanamnese entdeckt (Atwal et al. 2005; Quinn 2007). Die genaue Bedeutung scheint bislang jedoch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.5 Untersuchung der neuromodulierenden Eigenschaften der PF

Die AM-assoziierten Milieuveränderungen scheinen sich nur auf den Uterus zu beschränken. Um diese Hypothese belegen zu können, wurde mittels neuronalem Wachstumsassay untersucht, inwieweit es bei vorliegender AM auch zu Veränderungen der PF kommt. Dazu wurde PF von Frauen mit und ohne AM und EM getestet. Die PF von Frauen mit AM bewirkt dabei eine ähnliche neuronale Aussprossung wie die PF von Frauen ohne AM und EM.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde PF von gesunden Frauen und Frauen mit peritonealer EM in einem neuronalen Wachstumsassay inkubiert. Dabei konnte

gezeigt werden, dass die PF von Frauen mit EM zu einer signifikant vermehrten Neuritenaussprossung embryonaler sensibler Hinterwurzelganglien und im Gegensatz zur verminderten Aussprossung sympathischer paravertebraler Ganglien führte (Arnold et al. 2011). In dieser hier vorliegenden Studie konnten keine Unterschiede zwischen der AM-Gruppe und der Kontrollgruppe beobachtet werden. Da in diesem Versuch Frauen mit einer Koinzidenz von AM und EM ausgeschlossen wurden und somit nur die Peritonealflüssigkeit von Frauen mit AM mit der Kontrollgruppe verglichen wurde, lassen sich die Ergebnisse dadurch erklären, dass das Krankheitsbild der AM im Gegensatz zur EM völlig auf den Uterus beschränkt ist und somit keine Verbindung der Läsionen zur Peritonealhöhle besteht. Die Peritonealflüssigkeit wird demnach nicht von dem Vorliegen einer Adenomyose beeinflusst. Im Gegensatz dazu scheinen die peritonealen Läsionen die PF direkt zu beeinflussen. Der Versuch in dieser Studie zeigt, dass dies bei einem Vorliegen von AM nicht der Fall ist.

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die uterine Innervation von Patientinnen mit Adenomyosis uteri charakterisiert und mit gesunden Patientinnen aus der Kontrollgruppe verglichen werden. Mittels immunhistochemischer Methoden konnten intakte myelinisierte und unmyelinisierte, myelinisierte, sympathische und sensible NF charakterisiert und deren Verteilung in den verschiedenen Schichten des Uterus ausgewertet werden. Sowohl das Stratum functionale als auch das Stratum basale des Endometriums werden in beiden Gruppen kaum innerviert. Innerhalb der AM-Läsionen sowie in der unmittelbaren Umgebung ließen sich ebenfalls keine NF darstellen. Im Gegensatz dazu konnten mit allen verwendeten Markern NF im Myometrium dargestellt werden. Dabei war in den Gewebeschnitten von Patientinnen mit AM die Nervenfaserdichte geringer als in den Präparaten der Kontrollgruppe. Interessanterweise waren es vor allem die sympathischen NF, die signifikant reduziert im Myometrium nachgewiesen werden konnten. Bei der Analyse der Zyklusphasen konnte innerhalb der Kontrollgruppe eine Reduktion der sympathischen Innervation während der sekretorischen Phase dargestellt werden, während ein ähnlicher zyklusabhängiger Unterschied innerhalb der AM-Gruppe nicht beobachtet werden konnte. Mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen wurde des Weiteren die Expression von Östrogenrezeptoren (ER) α und β in sympathischen NF untersucht. Auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen AM und KG. Während in der KG ein Verhältnis von ER α zu ER β von 1:2 vorlag, war bei Patientinnen mit AM das Verhältnis zugunsten von ER α verschoben (Verhältnis ER α zu ER β 0,85:1).

Zusammengefasst belegt diese Studie, dass bei Patientinnen mit AM ein zyklusunabhängiger Rückgang sympathischer NF im Myometrium vorliegt und dass dieses Phänomen möglicherweise durch eine lokale Östrogenüberexpression sowie durch ein Missverhältnis von ER α zu ER β bedingt ist. Weitere beteiligte Mechanismen, wie zum Beispiel die Semaphorine oder die Adrenorezeptoren, sollten daher dringend untersucht werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Al-Jefout, M., N. Andreadis, et al. (2007). "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 197(6): 578 e1-4.

Al-Jefout, M., G. Dezarnaulds, et al. (2009). "Diagnosis of endometriosis by detection of nerve fibres in an endometrial biopsy: a double blind study." Hum Reprod 24(12): 3019-24.

Arnold, J., M. L. Barcena de Arellano, et al. (2011). "Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis." Brain Behav Immun 26(1): 132-41.

Atwal, G., D. du Plessis, et al. (2005). "Uterine innervation after hysterectomy for chronic pelvic pain with, and without, endometriosis." Am J Obstet Gynecol 193(5): 1650-5.

Azziz, R. (1989). "Adenomyosis: current perspectives." Obstet Gynecol Clin North Am 16(1): 221-35.

Ballester, M., E. M. d'Argent, et al. (2012). "Cumulative pregnancy rate after ICSI-IVF in patients with colorectal endometriosis: results of a multicentre study." Hum Reprod 27(4): 1043-9.

Barcena de Arellano, M. L., J. Arnold, et al. (2010). "Overexpression of nerve growth factor in peritoneal fluid from women with endometriosis may promote neurite outgrowth in endometriotic lesions." Fertil Steril 95(3): 1123-6.

Barcena de Arellano, M. L., A. Fiebitz, et al. (2010a). "Endometriose und Nervenfasern - Ist Endometriose durch den Nachweis von Nervenfasern im Endometrium diagnostizierbar?" Gynäkologe 43: 901-999.

Barcena de Arellano, M. L., M. F. Wagner, et al. (2012). "Neurotrophin expression is not affected in uteri of women with adenomyosis." J Mol Neurosci 47(3): 495-504.

Barrier, B. F., M. J. Malinowski, et al. (2004). "Adenomyosis in the baboon is associated with primary infertility." Fertil Steril 82 Suppl 3: 1091-4.

Benagiano, G. and I. Brosens (2006). "History of adenomyosis." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 20(4): 449-63.

Bergeron, C., F. Amant, et al. (2006). "Pathology and physiopathology of adenomyosis." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 20(4): 511-21.

Bergholt, T., L. Eriksen, et al. (2001). "Prevalence and risk factors of adenomyosis at hysterectomy." Hum Reprod 16(11): 2418-21.

Bird, C. C., T. W. McElin, et al. (1972). "The elusive adenomyosis of the uterus--revisited." Am J Obstet Gynecol 112(5): 583-93.

Bolden, D. A., C. Sternini and L. Kruger (1997). "GAP-43 mRNA and calcitonin gene-related peptide mRNA expression in sensory neurons are increased following sympathectomy." Brain Res Bull 42(1): 39-50.

Brauer, M. M., A. M. Corbacho, et al. (1995). "Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the developing noradrenaline-containing nerves of the rat uterus." Int J Dev Neurosci 13(8): 791-8.

Capellino, S. and R. H. Straub (2008). "Neuroendocrine immune pathways in chronic arthritis." Best Pract Res Clin Rheumatol 22(2): 285-97.

Chen, H., Z. He, et al. (1998). "Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins." Neuron 21(6): 1283-90.

Couse, J. F., J. Lindzey, et al. (1997). "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse." Endocrinology 138(11): 4613-21.

Cutolo, M., S. Capellino, et al. (2006). "Estrogens and autoimmune diseases." Ann N Y Acad Sci 1089: 538-47.

Cutolo, M. and R. H. Straub (2000). "Recent aspects of gonadal hormone and neurotransmitter interactions with synovial and immune cells: implications in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis 59(9): 657-61.

Dahlman-Wright, K., V. Cavailles, et al. (2006). "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors." Pharmacol Rev 58(4): 773-81.

Devlieger, R., T. D'Hooghe, et al. (2003). "Uterine adenomyosis in the infertility clinic." Hum Reprod Update 9(2): 139-47.

Dhillon, A. P., J. Rode, et al. (1985). "Neural markers in carcinoma of the lung." Br J Cancer 51(5): 645-52.

Dmitrovic, R., A. R. Kunselman, et al. (2012). "Continuous compared with cyclic oral contraceptives for the treatment of primary dysmenorrhea: a randomized controlled trial." Obstet Gynecol 119(6): 1143-50.

Ebert, A. D. (2003). Endometriose - Ein Wegweiser für die Praxis. Berlin, Walter de Gruyter Verlag.

Enmark, E. and J. A. Gustafsson (1999). "Oestrogen receptors - an overview." J Intern Med 246(2): 133-8.

Fanghänel, Pera, et al. (2003). Waldeyer Anatomie des Menschen. Berlin, de Gruyter.

Fassold, A., W. Falk, et al. (2009). "Soluble neuropilin-2, a nerve repellent receptor, is increased in rheumatoid arthritis synovium and aggravates sympathetic fiber repulsion and arthritis." Arthritis Rheum 60(10): 2892-901.

Fassold, A. and R. H. Straub (2010). "A new assay for nerve fiber repulsion." Ann N Y Acad Sci 1193: 43-7.

Ferenczy, A. (1998). "Pathophysiology of adenomyosis." Hum Reprod Update 4(4): 312-22.

Ferrer, M. and G. Osol (1998). "Estrogen replacement modulates resistance artery smooth muscle and endothelial alpha2-adrenoceptor reactivity." Endothelium 6(2): 133-41.

Ferrero, S., S. Haas, et al. (2010). "Loss of sympathetic nerve fibers in intestinal endometriosis." Fertil Steril 94(7): 2817-9.

Ferretti, A., E. Boschi, A. Stefani, et al. (2003). "Angiogenesis and nerve regeneration in a model of human skin equivalent transplant." Life Sci **73**(15): 1985-94.

Garcia-Segura, L. M. (2008). "Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore." J Neuroendocrinol **20**(6): 705-12.

Goshima, Y., Y. Sasaki, et al. (2000). "Functions of semaphorins in axon guidance and neuronal regeneration." Jpn J Pharmacol **82**(4): 273-9.

Haas, S., S. Capellino, et al. (2010). "Low density of sympathetic nerve fibers relative to substance P-positive nerve fibers in lesional skin of chronic pruritus and prurigo nodularis." J Dermatol Sci **58**(3): 193-7.

Haase, E. B., J. Buchman, et al. (1997). "Pregnancy-induced uterine neuronal degeneration in the rat." Cell Tissue Res **288**(2): 293-306.

Harle, P., R. H. Straub, et al. (2006). "Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems." Ann Rheum Dis **65**(1): 51-6.

Ieda, M. and K. Fukuda (2009). "New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: the regulatory mechanisms of cardiac innervation and their critical roles in cardiac performance." J Pharmacol Sci **109**(3): 348-53.

Kavelaars, A., F. Jeurissen, et al. (1994). "Substance P receptors and signal transduction in leukocytes." Immunomethods **5**(1): 41-8.

Keckstein, J. (2000). "Hysteroscopy and adenomyosis." Contrib Gynecol Obstet **20**: 41-50.

Kepkep, K., Y. A. Tuncay, et al. (2007). "Transvaginal sonography in the diagnosis of adenomyosis: which findings are most accurate?" Ultrasound Obstet Gynecol **30**(3): 341-5.

Kitawaki, J. (2006). "Adenomyosis: the pathophysiology of an oestrogen-dependent disease." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **20**(4): 493-502.

Kitawaki, J., T. Noguchi, et al. (1997). "Expression of aromatase cytochrome P450 protein and messenger ribonucleic acid in human endometriotic and adenomyotic tissues but not in normal endometrium." Biol Reprod 57(3): 514-9.

Kolodkin, A. L. and D. D. Ginty (1997). "Steering clear of semaphorins: neuropilins sound the retreat." Neuron 19(6): 1159-62.

Koopman, F. A., S. P. Stoof, et al. (2011). "Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis." Mol Med 17(9-10): 937-48.

Korach, K. S., J. F. Couse, et al. (1996). "Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes." Recent Prog Horm Res 51: 159-86; discussion 186-8.

Krantz, K. E. (1959). "Innervation of the human uterus." Ann N Y Acad Sci 75: 770-84.

Krizsan-Agbas, D., T. Pedchenko, et al. (2003). "Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus." Eur J Neurosci 18(10): 2760-8.

Krizsan-Agbas, D. and P. G. Smith (2002). "Estrogen modulates myometrium-induced sympathetic neurite formation through actions on target and ganglion." Neuroscience 114(2): 339-47.

Kuiper, G. G. and J. A. Gustafsson (1997). "The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens." FEBS Lett 410(1): 87-90.

Kunz, G., D. Beil, et al. (2000). "Structural abnormalities of the uterine wall in women with endometriosis and infertility visualized by vaginal sonography and magnetic resonance imaging." Hum Reprod 15(1): 76-82.

Kunz, G., D. Beil, et al. (2005). "Adenomyosis in endometriosis--prevalence and impact on fertility. Evidence from magnetic resonance imaging." Hum Reprod 20(8): 2309-16.

Latini, C., A. Frontini, et al. (2008). "Remodeling of uterine innervation." Cell Tissue Res 334(1): 1-6.

Leiblich, A., S. S. Cross, et al. (2007). "Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A." Prostate 67(16): 1761-9.

Levgur, M. (2007). "Therapeutic options for adenomyosis: a review." Arch Gynecol Obstet 276(1): 1-15.

Levy, G., A. Dehaene, et al. (2012). "An update on adenomyosis." Diagn Interv Imaging 94(1): 3-25.

Leyendecker, G. and G. Kunz (2005). "[Endometriosis and adenomyosis]." Zentralbl Gynakol 127(5): 288-94.

Leyendecker, G., G. Kunz, et al. (2004). "Uterine peristaltic activity and the development of endometriosis." Ann N Y Acad Sci 1034: 338-55.

Leyendecker, G., G. Kunz, et al. (2006). "Adenomyosis and reproduction." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 20(4): 523-46.

Leyendecker, G., L. Wildt, et al. (2009). "The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair." Arch Gynecol Obstet 280(4): 529-38.

Li, Y., S. F. Zhang, et al. (2011). "Accumulation of nerve growth factor and its receptors in the uterus and dorsal root ganglia in a mouse model of adenomyosis." Reprod Biol Endocrinol 9: 30.

Lotz, M., J. H. Vaughan, et al. (1988). "Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes." Science 241(4870): 1218-21.

Matalliotakis, I. M., I. K. Katsikis, et al. (2005). "Adenomyosis: what is the impact on fertility?" Curr Opin Obstet Gynecol 17(3): 261-4.

Mathur, B. B., B. S. Shah, et al. (1962). "Adenomyosis uteri. A pathologic study of 290 cases." Am J Obstet Gynecol 84: 1820-9.

Mechsner, S., J. Bartley, et al. (2002). "[Endometrial carcinoma using GnRH analogues therapy in endometriosis]." Zentralbl Gynakol 124(10): 478-81.

Mechsner, S., B. Grum, et al. (2010). "Possible roles of oxytocin receptor and vasopressin-1alpha receptor in the pathomechanism of dysperistalsis and dysmenorrhea in patients with adenomyosis uteri." Fertil Steril 94(7): 2541-6.

Mechsner, S., A. Kaiser, et al. (2009). "A pilot study to evaluate the clinical relevance of endometriosis-associated nerve fibers in peritoneal endometriotic lesions." Fertil Steril 92(6): 1856-61.

Mechsner, S., J. Schwarz, et al. (2007). "Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions." Fertil Steril 88(3): 581-7.

Mei, Q., T. O. Munding, et al. (2002). "Early, selective, and marked loss of sympathetic nerves from the islets of BioBreeder diabetic rats." Diabetes 51(10): 2997-3002.

Meyer, M. R., E. R. Prossnitz, et al. (2011). "The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function." Vascul Pharmacol 55(1-3): 17-25.

Miller, L. E., H. P. Justen, et al. (2000). "The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages." Faseb J 14(13): 2097-107.

Nimmo, A. J., E. M. Whitaker, et al. (1989). "The presence of beta-adrenoceptors in rat endometrium is dependent on circulating oestrogen." J Endocrinol 122(2): R1-4.

Noble, L. S., E. R. Simpson, et al. (1996). "Aromatase expression in endometriosis." J Clin Endocrinol Metab 81(1): 174-9.

Osada, H., S. Silber, et al. (2010). "Surgical procedure to conserve the uterus for future pregnancy in patients suffering from massive adenomyosis." Reprod Biomed Online 22(1): 94-9.

Papka, R. E., M. Storey-Workley, et al. (2001). "Estrogen receptor-alpha and beta-immunoreactivity and mRNA in neurons of sensory and autonomic ganglia and spinal cord." Cell Tissue Res 304(2): 193-214.

Parrott, E., M. Butterworth, et al. (2001). "Adenomyosis--a result of disordered stromal differentiation." Am J Pathol 159(2): 623-30.

Pelletier, G. and M. El-Alfy (2000). "Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs." J Clin Endocrinol Metab 85(12): 4835-40.

Petitti, N. and A. M. Etgen (1990). "Alpha 1-adrenoceptor augmentation of beta-stimulated cAMP formation is enhanced by estrogen and reduced by progesterone in rat hypothalamic slices." J Neurosci 10(8): 2842-9.

Quinn, M. (2007). "Uterine innervation in adenomyosis." J Obstet Gynaecol 27(3): 287-91.

Quinn, M. J. and N. Kirk (2002). "Differences in uterine innervation at hysterectomy." Am J Obstet Gynecol 187(6): 1515-9; discussion 1519-20.

Reinhold, C., F. Tafazoli, et al. (1998). "Imaging features of adenomyosis." Hum Reprod Update 4(4): 337-49.

Richeri, A., P. Bianchimano, et al. (2005). "Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors." J Anat 207(2): 125-34.

Richeri, A., C. Chalar, et al. (2011). "Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus." Auton Neurosci 164(1-2): 43-50.

Riemer, R. K., A. Goldfien, et al. (1987). "Rabbit myometrial adrenergic sensitivity is increased by estrogen but is independent of changes in alpha adrenoceptor concentration." J Pharmacol Exp Ther 240(1): 44-50.

Riemer, R. K., Y. Y. Wu, et al. (1988). "Estrogen reduces beta-adrenoceptor-mediated cAMP production and the concentration of the guanyl nucleotide-regulatory protein, Gs, in rabbit myometrium." Mol Pharmacol 33(4): 389-95.

Rone, M. B., J. Fan, et al. (2009). "Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states." Biochim Biophys Acta 1791(7): 646-58.

Sahin, A. A., E. G. Silva, et al. (1989). "Endometrial tissue in myometrial vessels not associated with menstruation." Int J Gynecol Pathol 8(2): 139-46.

Sar, M. and I. Parikh (1986). "Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies." J Steroid Biochem 24(2): 497-503.

Shughrue, P. J., M. V. Lane, et al. (1997). "Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system." J Comp Neurol 388(4): 507-25.

Simonian, S. X. and A. E. Herbison (1997). "Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus." J Neuroendocrinol 9(11): 803-6.

Sporrong, B., P. Alm, et al. (1981). "Pregnancy is associated with extensive adrenergic nerve degeneration in the uterus. An electronmicroscopic study in the guinea-pig." Neuroscience 6(6): 1119-26.

Straub, R. H. (2007). "Autoimmune disease and innervation." Brain Behav Immun 21(5): 528-34.

Straub, R. H. (2007). "The complex role of estrogens in inflammation." Endocr Rev 28(5): 521-74.

Straub, R. H., F. Grum, et al. (2008). "Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation." Gut 57(7): 911-21.

Straub, R. H. and P. Harle (2005). "[Stress, hormones, and neuronal signals in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. The negative impact on chronic inflammation]." Med Klin (Munich) 100(12): 794-803.

Takahashi, K., H. Nagata, et al. (1989). "Clinical usefulness of determination of estradiol level in the menstrual blood for patients with endometriosis." Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 41(11): 1849-50.

Tariverdian, N., T. C. Theoharides, et al. (2007). "Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach." Semin Immunopathol 29(2): 193-210.

Tokushige, N., R. Markham, et al. (2006). "High density of small nerve fibres in the functional layer of the endometrium in women with endometriosis." Hum Reprod 21(3): 782-7.

Tokushige, N., R. Markham, et al. (2006a). "Nerve fibres in peritoneal endometriosis." Hum Reprod 21(11): 3001-7.

Tokushige, N., R. Markham, et al. (2008). "Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis." Fertil Steril 90(5): 1589-98.

Valentini, A. L., S. Specca, et al. (2011). "Adenomyosis: from the sign to the diagnosis. Imaging, diagnostic pitfalls and differential diagnosis: a pictorial review." Radiol Med 116(8): 1267-87.

Vass-Lopez, A., R. Garcia-Villar, et al. (1990). "Influence of steroid hormone treatments or pregnancy on [3H]prazosin and [3H]rauwolscine binding to myometrial alpha-adrenoceptors in the ewe." J Endocrinol 127(3): 471-9.

Vavilis, D., T. Agorastos, et al. (1997). "Adenomyosis at hysterectomy: prevalence and relationship to operative findings and reproductive and menstrual factors." Clin Exp Obstet Gynecol 24(1): 36-8.

Vercellini, P., I. Cortesi, et al. (1998). "Transvaginal ultrasonography versus uterine needle biopsy in the diagnosis of diffuse adenomyosis." Hum Reprod 13(10): 2884-7.

Wang, P. H., W. H. Su, et al. (2009). "Adenomyosis and its variance: adenomyoma and female fertility." Taiwan J Obstet Gynecol 48(3): 232-8.

Weidner, N., J. P. Semple, et al. (1991). "Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma." N Engl J Med 324(1): 1-8.

Wikland, M., B. Lindblom, et al. (1984). "Structural and functional evidence for the denervation of human myometrium during pregnancy." Obstet Gynecol 64(4): 503-9.

Yamada, M. (1988). "[Changes in the innervation of the uterus during pregnancy and following parturition. Histochemical and electron microscopic observations in rat and humans]." Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 40(2): 145-52.

Yamamoto, T., J. Kitawaki, et al. (1993). "Estrogen productivity of endometrium and endometrial cancer tissue; influence of aromatase on proliferation of endometrial cancer cells." J Steroid Biochem Mol Biol 44(4-6): 463-8.

Yamamoto, T., T. Noguchi, et al. (1993a). "Evidence for estrogen synthesis in adenomyotic tissues." Am J Obstet Gynecol 169(3): 734-8.

Zhang, X., B. Lu, et al. (2009). "Innervation of endometrium and myometrium in women with painful adenomyosis and uterine fibroids." Fertil Steril 94(2): 730-7.

Zhang, X., B. Lu, et al. (2009a). "Endometrial nerve fibers in women with endometriosis, adenomyosis, and uterine fibroids." Fertil Steril 92(5): 1799-801.

Zoubina, E. V., Q. Fan, et al. (1998). "Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat." J Comp Neurol 397(4): 561-71.

Zoubina, E. V., A. L. Mize, et al. (2001). "Acute and chronic estrogen supplementation decreases uterine sympathetic innervation in ovariectomized adult virgin rats." Histol Histopathol 16(4): 989-96.

Zoubina, E. V. and P. G. Smith (2000). "Axonal degeneration and regeneration in rat uterus during the estrous cycle." Auton Neurosci 84(3): 176-85.

Zoubina, E. V. and P. G. Smith (2001). "Sympathetic hyperinnervation of the uterus in the estrogen receptor alpha knock-out mouse." Neuroscience 103(1): 237-44.

Zoubina, E. V. and P. G. Smith (2002). "Distributions of estrogen receptors alpha and beta in sympathetic neurons of female rats: enriched expression by uterine innervation." J Neurobiol 52(1): 14-23.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: unterschiedliche Formen von AM.....	14
Abbildung 2: Adenomyosis uteri.....	15
Abbildung 3: Bildgebende Verfahren zur Diagnostik der AM.....	17
Abbildung 4: immunhistochemische Darstellung der endometrialen-myometrialen Junktionalzone	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung des TIAR-Pathomechanismus.....	20
Abbildung 6: schematische Darstellung des Einflusses sympathischer und sensibler NF auf das Entzündungsgebiet.....	24
Abbildung 7: Darstellung der Zyklusabhängigkeit der sympathischen NF.....	26
Abbildung 8: NF im uterinen Gewebe von Frauen mit und ohne AM.....	46
Abbildung 9: Histologische Darstellung von Myometrium und Endometrium	47
Abbildung 10: Verminderte NF-Dichte im Myometrium bei Patientinnen mit AM im Vergleich zur KG	49
Abbildung 11: S 100-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten.....	50
Abbildung 12: PGP 9.5-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten	50
Abbildung 13: TH-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten.....	51
Abbildung 14: Substanz P-positive NF bei Patientinnen mit und ohne AM in den einzelnen anatomischen Schichten	51
Abbildung 15: Histologische Darstellung einer typischen adenomyotischen Läsion mit endometrialen Drüsen und Stromazellen im Myometrium	52
Abbildung 16: Anzahl TH-positiver NF im Myometrium von Frauen mit und ohne AM.....	54
Abbildung 17: Anzahl TH-positiver NF im Myometrium von Frauen mit und ohne AM.....	56
Abbildung 18: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM bezüglich der Schmerzen.....	57
Abbildung 19: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen der KG bezüglich der Schmerzen.....	57
Abbildung 20: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen ohne AM bezüglich der Gravidität	58

Abbildung 21: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM bezüglich der Gravidität	58
Abbildung 22: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen ohne AM bezüglich der Parität	59
Abbildung 23: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM bezüglich der Parität	60
Abbildung 24: Charakterisierung der NF-Dichte im Myometrium von Frauen mit AM alleine und mit einer Koinzidenz von AM und EM	61
Abbildung 25: immunhistochemische Darstellung der Kolo-kalisation von ER α und ER β in sympathischen TH-positiven NF von Frauen mit und ohne AM.....	62
Abbildung 26: Darstellung der Kolo-kalisation von ER α und ER β in % in sympathischen TH-positiven NF von Frauen mit und ohne AM	62
Abbildung 27: Neuritenausprossung aus sympathischen paravertebralen Ganglien.....	63
Abbildung 28: Neuritenausprossung aus sympathischen paravertebralen Ganglien inkubiert in PF von Frauen mit und ohne AM	64
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paravertebralen Ganglien	64
Abbildung 30: Einfluss sensibler und sympathischer NF bei Entzündung	72

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientinnenkollektiv für die immunhistochemische Analyse	34
Tabelle 2: Patientinnenkollektiv für das neuronale Wachstumassay	35
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper für Immunhistochemie (IHC).....	37
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper für IHC	38
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper für die IHC-Doppelfärbung.....	39
Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper für die IHC-Doppelfärbung.....	40
Tabelle 7: Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paraventralen Ganglien	43
Tabelle 8: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung der sympathischen paraventralen Ganglien	44
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Marker. NF= Nervenfasern.....	46
Tabelle 10: NF-Dichte / mm ² im Patientinnenkollektiv bezogen auf die anatomischen Schichten	48
Tabelle 11: NF-Dichte pro mm ² in der Läsion und in Läsionsnähe einer AM-Patientin.	52
Tabelle 12: NF-Dichte pro mm ² im Patientenkollektiv bezogen auf die Zyklusphasen	54
Tabelle 13: NF-Dichte pro mm ² im Patientinnenkollektiv bezogen auf den Hormonstatus.....	55

Publikationsliste

Originalarbeiten:

Oldeweme J, Barcena de Arellano ML, Arnold J, Schneider A, Mechsner S. (2013). ***“Untersuchungen zum östrogenabhängigen Remodelling sympathischer Nervenfasern bei Adenomyosis uteri”***. GebFra (eingereicht)

Barcena de Arellano ML, **Oldeweme J**, Arnold J, Schneider A, Mechsner S. (2013). ***“Estrogen-dependent sympathetic nerve fibres remodelling seems to be disturbed in adenomyosis ”***. Fertil Steril (in Revision)

Barcena de Arellano ML, Wagner MF, **Oldeweme J**, Arnold J, Ebert A, Schneider A, Mechsner S. (2012). ***“Neurotrophin Expression Is Not Affected in Uteri of Women with Adenomyosis”***. J Mol Neurosci, 47 (3): 495-504.

Vorträge:

Oldeweme J, Barcena de Arellano ML, Reichelt U, Mechsner S. (2012) ***“Estrogen-dependent sympathetic nerve fibers remodeling seems to be disturbed in adenomyosis uteri”*** World Congress of Gynecological Endocrinology III Congresso ISGE (Florenz, Italien)

Barcena de Arellano ML, **Oldeweme J**, Schneider A, Mechsner S. (2013) ***“Disruption of the estrogen-dependent sympathetic nerve fibers remodelling in adenomyosis uteri”*** Gebin 2013, Regensburg

Barcena de Arellano ML, **Oldeweme J**, Schneider A, Mechsner S. (2013)
**„Östrogen-abhängige Remodelling von sympathischen uterinen Nervenfasern
scheint in der Adenomyose gestört zu sein“** 10. Deutschsprachiger
Endometriosekongress 2013, Linz

Posterpräsentationen:

Oldeweme J, Barcena de Arellano ML, Arnold J, Schneider A, Mechsner S. (2012).
**“Estrogen-modulated sympathetic nerve fibre depletion in Adenomyosis uteri
seems to be disturbed”** Eshre 2012, Hum Reprod 27 (Supplement 1): i220.

Oldeweme J, Barcena de Arellano M, Bartley J, Reichelt U, Mechsner S. (2011).
**„Charakterisierung von sympathischen und sensiblen Nervenfasern in
Adenomyosis uteri“** 9. Deutscher Endometriosekongress 2011, Emmendingen,
GebFra, p 467.

Barcena de Arellano ML, **Oldeweme J**, Bartley J, Reichelt U, Mechsner S. (2011).
“Characterisation of sympathetic and sensory nerve fibers in adenomyosis“
11th World Congress of Endometriosis, Abstraktbuch p 126.

Lebenslauf

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

eidesstattliche Versicherung

Ich, Jeannette Oldeweme, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zum östrogenabhängigen Remodelling sympathischer Nervenfasern bei Adenomyosis uteri“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Jeannette Oldeweme hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Oldeweme J**, Barcena de Arellano ML, Arnold J, Schneider A, Mechsner S. (2013). ***“Untersuchungen zum östrogenabhängigen Remodelling sympathischer Nervenfasern bei Adenomyosis uteri”***. GebFra (eingereicht)

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der experimentellen Arbeiten
(Immunhistochemie, neuronales Wachstumsassay)
Statistik
Auswertung der Daten
Schriftliche Umsetzung der Publikation

Publikation 2: Barcena de Arellano ML, **Oldeweme J**, Arnold J, Schneider A, Mechsner S. (2013). ***“Estrogen-dependent sympathetic nerve fibres remodelling seems to be disturbed in adenomyosis ”***. Fertil Steril (in Revision)

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der experimentellen Arbeiten
(Immunhistochemie, neuronales Wachstumsassay)
Statistik
Auswertung der Daten

Publikation 3: Barcena de Arellano ML, Wagner MF, **Oldeweme J**, Arnold J, Ebert A, Schneider A, Mechsner S, ***“Neurotrophin Expression Is Not Affected in Uteri of Women with Adenomyosis”***, J Mol Neurosci, 47 (3): 495-504, 2012

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der PGP 9.5-Färbung inkl. Statistik und Auswertung der Daten

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Sylvia Mechsner für die Vergabe des Promotionsthemas bedanken. Das mir entgegen gesetzte Vertrauen in diese Arbeit führte dazu, dass ich mich im Endometrioseforschungslabor der Charité, Berlin sehr wohl gefühlt habe und ich mich als Doktorandin stets als Mitglied des gesamten Teams betrachten konnte. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau PD Dr. Sylvia Mechsner für die Möglichkeit der Teilnahme an Kongressen bedanken, durch die mein Interesse an der Wissenschaft durchaus gewachsen ist.

Mein besonderer Dank geht an Maria Luisa Barcena de Arellano für die kompetente und stets zuverlässige Betreuung meiner Promotion. Die vielen wissenschaftlichen Ratschläge, Anregungen sowie gemeinsame Diskussionen haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Promotion beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich beim gesamten Labor-Team für die Unterstützung und Hilfestellung bei den experimentellen Arbeiten bedanken, wobei ein besonderes Dankeschön insbesondere an Julia Arnold geht, die mir mit vielen Vorschlägen und Anregungen stets hilfreich zur Seite stand.

Meinem Freund Niels möchte ich an dieser Stelle besonders für die moralische Unterstützung und ebenso die vielen hilfreichen Ratschläge zur Gestaltung dieser Arbeit danken.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank für ihr uneingeschränktes Vertrauen in mich. Sie haben mir das Studium der Zahnmedizin und somit auch diese Promotion ermöglicht und haben mich in allen Lebensphasen stets hingebungsvoll unterstützt.